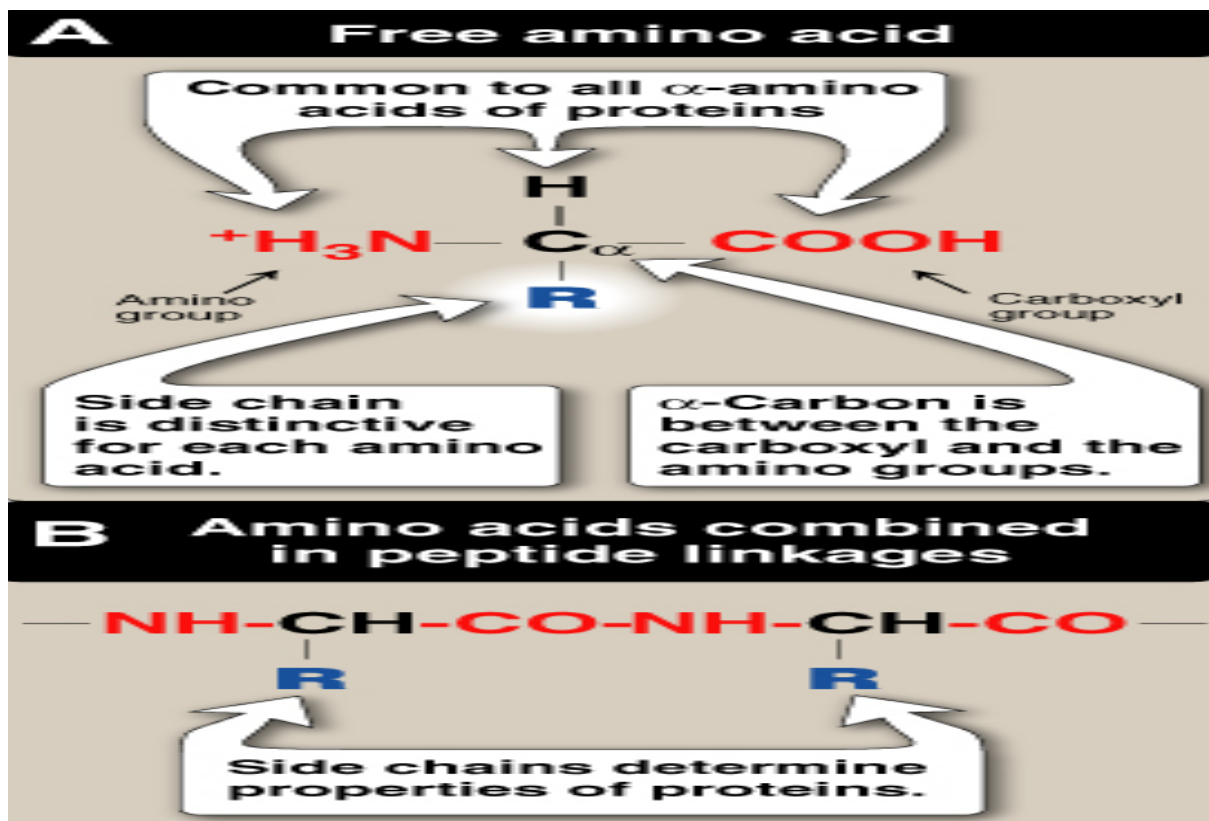


Εισαγωγικά στοιχεία για πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες είναι τα πιο άφθονα και λειτουργικά ποικίλα μορία σε ζωντανά συστήματα. Σχεδόν κάθε διαδικασία της ζωής εξαρτάται από πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες διαφέρουν μεταξύ τους ανάλογα με το είδος, τον αριθμό και την ακολουθία των αμινοξέων που συνθέτουν το πολυπεπτίδιο σκελετό. Ως αποτέλεσμα έχουν διαφορετικές μοριακές δομές, θρεπτικές ιδιότητες και φυσικοχημικές ιδιότητες. Γενικά οι πρωτεΐνες στον οργανισμό μας κατηγοριοποιούνται ανάλογα με την λειτουργία τους ως επί το πλείστον, αλλά γίνεται και κατηγοριοποίηση ανάλογα με την μορφή τους σε ινώδεις και σφαιρικές ή ανάλογα με την σύνθεση τους σε απλές και σύνθετες. Ορισμένες από τις βασικές λειτουργίες των πρωτεϊνών περιγράφονται παρακάτω:

- Μεταφορικές πρωτεΐνες: μεταφορά μικρών μορίων και ιόντων π.χ O_2 .
- Ένζυμα: καταλύουν βιοχημικές αντιδράσεις
- Δομικές πρωτεΐνες: μηχανική στήριξη του σώματος, κυττάρου, χωρίζονται σε εξωκυτταρικές(κολλαγόνο) και εσωκυτταρικές(ινίδια ακτίνης, μικροσωληνίσκοι, ενδιάμεσα ινίδια)
- Κινητήριες πρωτεΐνες: αφορούν την κίνηση οργανιδίων π.χ μυοσίνη και κινησίνη αλληλεπιδρούν με μικροσωληνίσκους για μεταφορά οργανιδίων
- Αποθηκευτικές πρωτεΐνες: αποθήκευση μορίων π.χ σίδηρος στο ήπαρ μέσω φερριτίνης
- Σηματοδοτικές πρωτεΐνες: μεταφορά σημάτων από κύτταρο σε κύτταρο
- Πρωτεΐνες υποδοχής: υποδοχέας ινσουλίνης για να προσλάβει γλυκόζη
- Πρωτεΐνες ρυθμιστές γονιδίων: συνδέονται με το DNA και ενεργοποιούν/καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων
- Πρωτεΐνες με ειδικές λειτουργίες: αντιψυκτικές, φθορίζουσες, συγκολλητικές

Οι πρωτεΐνες, με μοριακό βάρος από 10.000 μέχρι πάνω από 1 εκατομμύριο, αποτελούνται από αμινοξέα, τα οποία ενώνονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς σχηματίζοντας μια γραμμική αλυσίδα, καλούμενη αλυσίδα πολυπεπτιδίων. Όλες οι πρωτεΐνες περιέχουν άνθρακα, οξυγόνο και άζωτο και οι περισσότερες εξ αυτών και θείο. Αν και έχουν περιγραφεί στη φύση περισσότερα από 300 διαφορετικά αμινοξέα, μόνο είκοσι βρίσκονται συνήθως ως συστατικά των πρωτεϊνών των θηλαστικών. Κάθε αμινοξύ έχει μια καρβοξυλομάδα, μια αμινομάδα, και μια διακριτή πλευρική αλυσίδα (R-ομάδα) που συνδέεται με το άτομο του άνθρακα.



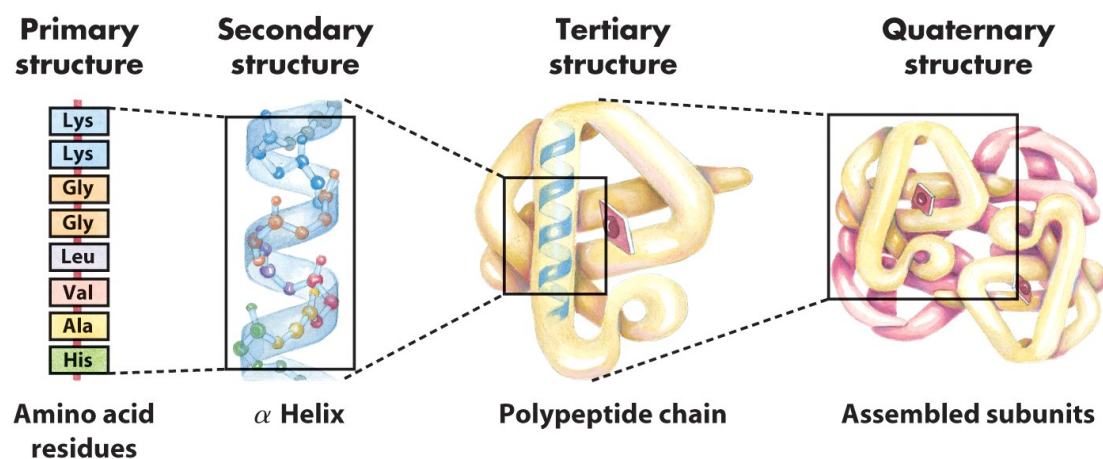
Η R-ομάδα σε κάθε αμινοξύ χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που εν τέλει καθορίζουν και τις ιδιότητες του αμινοξέως. Οι κατηγορίες είναι οι εξής:

- Αμινοξέα με μη πολικές πλευρικές ομάδες (R-ομάδα υδρόφοβη)
- Αμινοξέα με μη φορτισμένες πολικές πλευρικές ομάδες (περισσότερο διαλυτές στο νερό άρα υδρόφιλες ενώ περιέχουν λειτουργικές ομάδες που σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με το νερό)
- Αμινοξέα με όξινες πλευρικές ομάδες (αρνητικά φορτισμένες)
- Αμινοξέα με βασικές πλευρικές ομάδες (θετικά φορτισμένες)

Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται τα αμινοξέα ανάλογα με τις παραπάνω κατηγορίες.

	Acidic	Neutral		Basic
POLAR	Asp	Asn	Ser	Arg
		Gln	Cys	His
	Glu		Thr	Lys
NON-POLAR	Ala	Gly		
	Val	Ile	Met	Phe
		Leu		Trp
				Pro

Τα είκοσι αμινοξέα που βρίσκονται συνήθως στις πρωτεΐνες συνδέονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς. Η γραμμική αλληλουχία των συνδεδεμένων αμινοξέων περιέχει τις αναγκαίες πληροφορίες για να δημιουργήσει ένα μόριο πρωτεΐνης ένα μοναδικό τρισδιάστατο σχήμα. Η πολυπλοκότητα της δομής της πρωτεΐνης αναλύεται καλύτερα με την εξέταση του μορίου σε σχέση με τέσσερα οργανωτικά επίπεδα, δηλαδή, πρωτοταγής, δευτεροταγής, τριτοταγής και τεταρτοταγής.



Πρωτοταγής: Μια περιγραφή όλων των ομοιοπολικών δεσμών. Η πρωτοταγής δομή καθορίζεται από την κληρονομούμενη γενετική πληροφορία

Δευτεροταγής: Οι ελικοειδείς δομές και οι πτυχώσεις της δευτεροταγούς δομής οφείλονται στους δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται ανάμεσα στα επαναλαμβανόμενα συστατικά του σκελετού των αμινοξέων

Τριτοταγής: Η τριτοταγής δομή καθορίζεται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ομάδων R και όχι από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επαναλαμβανόμενων συστατικών του σκελετού των αμινοξέων. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ομάδων R περιλαμβάνουν υδρογονικούς δεσμούς, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και δυνάμεις van der Waals. Οι ισχυροί ομοιοπολικοί δεσμοί, οι δισουλφιδικές γέφυρες ενισχύουν τη πρωτεϊνική δομή ή τριτοταγής δομή.

Τεταρτοταγής: Η τεταρτοταγής δομή είναι το τελικό αποτέλεσμα της σύνδεσης δύο ή περισσότερων πολυπεπτιδικών αλυσίδων ώστε να σχηματιστεί ένα ενιαίο λειτουργικό μακρομόριο. Το κολλαγόνο είναι μια ινώδης πρωτεΐνη, που αποτελείται από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες που αναδιπλώνονται σαν σχοινί. Η αιμοσφαιρίνη είναι μια σφαιρική πρωτεΐνη που αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες: δύο α και δύο β αλυσίδες. Η τεταρτοταγής δομή.

Επεξεργάζοντας τις πρωτεΐνες

Στόχος πολλών βιολογικών πειραμάτων σε καλλιέργειες κυττάρων μπορεί να είναι ο καθορισμός της δομής, λειτουργικότητας, μορφής ή και ύπαρξης μιας πρωτεΐνης. Μετά από πολλά και χρονοβόρα συνήθως βήματα στόχος των ερευνητών είναι να καταλήξουν στην πρωτοταγή δομή της πρωτεΐνης, καθορίζοντας την αλληλουχία των αμινοξέων και το είδος των πεπτιδικών δεσμών. Η δυσκολία βέβαια είναι πολύ μεγάλη καθώς οι πρωτεΐνες αφού παραχθούν από τα ριβοσώματα, αποκτούν την πρωτοταγή τους δομή. Στην

συνέχεια όμως τα αμινοξέα που συνιστούν την πρωτεΐνη υφίστανται χημικές αλλαγές και μετα-μεταγραφική τροποποίηση προκειμένου να μπορέσει να λειτουργήσει η πρωτεΐνη είτε εντός είτε εκτός του κυττάρου.

Στο πρώτο στάδιο μελέτης των πρωτεϊνών είναι αναγκαία η απομόνωση της πρωτεΐνης από το κυτταρικό διάλυμα στο οποίο βρίσκεται. Αυτό επιτυγχάνεται με την διαδικασία του καθαρισμού. Προτού λάβουν χώρα οι διαδικασίες του καθαρισμού είναι αναγκαίο να εντοπιστεί η πρωτεΐνη στο διάλυμα μου. Αυτό είναι εφικτό εκμεταλευόμενοι τις ήδη γνωστές ιδιότητες γνωστών πρωτεϊνών, για παράδειγμα εάν θέλουμε να εντοπίσουμε την ύπαρξη ενζύμου βασιζόμαστε στην βιοχημική αντίδραση που επιτελεί. Χρήσιμη είναι η εύρεση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο διάλυμα, αντικείμενο που θα μας απασχολήσει παρακάτω στην σύνταξη του βιολογικού πρωτοκόλου.

Γνωρίζοντας τα παραπάνω στοιχεία μπορώ να υπολογίσω την ειδική

$$\text{δραστικότητα} = \frac{\text{ενζυμική δραστηριότητα}}{\text{συγκέντρωση όλων των πρωτεϊνών στο διάλυμα}}$$

Πρωτό βήμα του καθαρισμού είναι η φυγοκέντρωση η οποία αποτελείται από 3 φάσεις όπου στην κάθε μια το υπερκείμενο (κύτταρα δίχως μεμβράνη) φυγοκεντρείται με μεγαλύτερη ταχύτητα και για περισσότερη ώρα. Το υπερκείμενο τελευταίας φυγοκέντρωσης λέγεται κυτοσόλιο και περιέχει τις διαλυτές πρωτεΐνες. Όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα, επιτύχαμε καθίζηση του πηρυνικού κλάσματος, του μιτοχονδριακού και τέλος του μικροσωμικού.

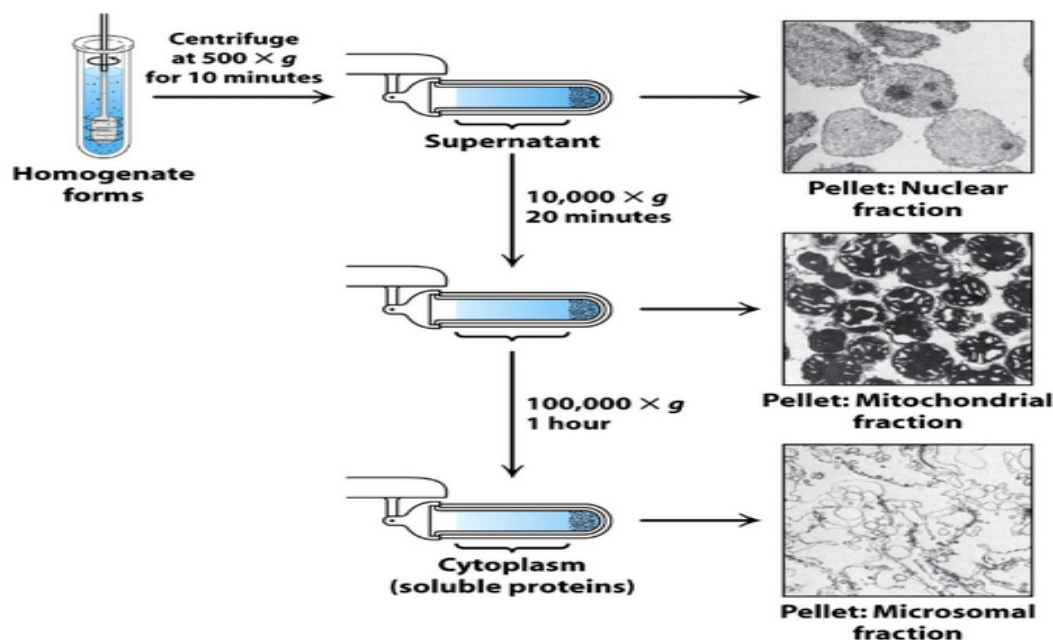
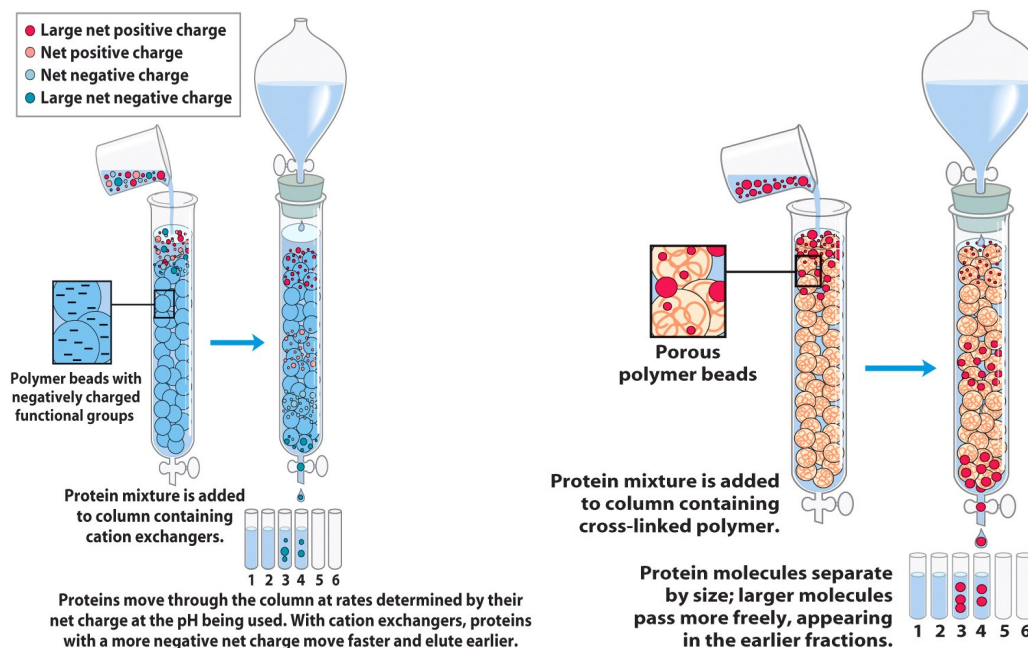


Figure 3-1
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Στην συνέχεια βασιζόμαστε στα γνωστά μοναδικά χαρακτηριστικά κάθε πρωτεΐνης προκειμένου να επιτύχουμε τον διαχωρισμό. Ορισμένες από αυτές τις διαδικασίες είναι η εξαλάτωση προκειμένου να πετύχω κλασμάτωση πρωτεϊνών και έπειτα διαπήδηση για απομάκρυνση του άλατος, χρωματογραφία διήθησης σε πήκτη για διαχωρισμό βάση μεγέθους, χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής για διαχωρισμό βάση φορτίου.



Έπειτα ακολουθεί το πιο περίπλοκο μέρος της διαδικασίας και σίγουρα το πιο ενδιαφέρον από ερευνητικό επίπεδο που δεν είναι άλλο από την ανάλυση των αμινοξέων. Η ποσότητα της πρωτεΐνης που απαιτείται για την ανίχνευση και ποσοτική ανάλυση θα μπορούσε να είναι τόσο χαμηλή όσο 0,05 nmol, ή 2.5ug. Βράζουμε το δείγμα μας σε HCl στους 120°C. Ονομάζουμε τα απελευθερωμένα αμινοξέα είτε πριν είτε μετά τη στήλη με μία κατάλληλη χρωστική ουσία (π.χ. φθορίζον ή Dabsyl-Cl, προσδιορισμός τελικού αμινοτικού άκρου). Εκτελούμε την ανάλυση RP-HPLC και συγκρίνουμε το δείγμα μας με πρότυπα. Χρειάζεται εξελιγμένα όργανα για τη συγκεκριμένη μέθοδο. Στην συνέχεια είναι επιθυμητή η ραδιοσήμανση με άλλες ετικέτες. Για παραδειγμα η τυροσίνη ιωδιώνεται με I_{125} ή I_{131} . Άλλες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών είναι η χρήση φθορίζουσων ετικετών όπως iTRAQ. Ειδικά όμως μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε την μέθοδο Edman ή να προσδιορίσουμε την αλληλουχία με χρήση DNA ή τέλος RP χρωματογραφία.

Όλα τα παραπάνω στοιχεία αποτελούν μια σύντομη παρουσίαση για τις πρωτεΐνες, τα χαρακτηριστικά τους και τους τρόπους με τους οποίους τις μελετάμε. Η συγκεκριμένη εισαγωγή γίνεται εσκεμμένα για να μπορέσει ο αναγνώστης να αποκτήσει μια βάση επί του θέματος και να μπορέσει να κατανοήσει τους λόγους που είναι σημαντικός ο καθορισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα που επεξεργαζόμαστε.

Καθορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Σχεδόν σε κάθε βιοχημική έρευνα είναι απαραίτητο να προσδιοριστεί με ακρίβεια η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο διάλυμα. Αρκετές μέθοδοι είναι διαθέσιμες, η κάθε μια έχει ιδιαίτερα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Για το λόγο αυτό οι περισσότεροι ερευνητές επιλέγουν να διαθέτουν στο εργαστήριο τους, αντιδραστήρια για παραπάνω από μια μεθόδους-δοκιμασίες εύρεσης της συγκέντρωσης πρωτεϊνών. Μάλιστα κάποιες φορές μπορεί το δείγμα μας να περιέχει συστατικά τα οποία δεν είναι συμβατά με καμία από τις υπάρχουσες

μεθόδους. Η λύση είναι να απομακρυνθούν αυτές οι ουσίες με φυγοκέντρηση, εξαλάτωση και διαπήδηση όπως αναλύθηκε στο παραπάνω εδάφιο.

Η διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος είναι πολύ σημαντική και προαπαιτούμενη πριν την έναρξη κάθε μεθόδου. Το σύνολο της διεργασίας πραγματοποιείται συνήθως σε κρύο με πρόσθετες προφυλάξεις που λαμβάνονται υπόψιν για την παρεμπόδιση της μικροβιακής ανάπτυξης ή για την αποφυγή μόλυνσης του δείγματος με ξένα σωματίδια όπως μαλλιά, δέρμα κ.α. Κατά την εργασία με τους ιστούς, κύτταρα ή στερεά, το πρώτο βήμα της διαδικασίας είναι η διαλυτοποίηση της δομής του δείγματος που επιτυγχάνεται με λειοτρίβηση ή κατεργασία με υπερήχους ή με τη χρήση ειδικά σχεδιασμένων αντιδραστήρια (π.χ. Rorpers [™] Κυτταρικής Λύσης Αντιδραστήρια) που περιέχουν επιφανειοδραστικές ουσίες για να λυθούν τα κύτταρα. Αυτό γίνεται σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει ένα ή περισσότερα επιφανειοδραστικά για να βοηθήσει την διαλυτοποίηση από τις δεσμευμένες σε μεμβράνη πρωτεΐνες, βιοκτόνα (αντιμικροβιακοί παράγοντες) και αναστολείς πρωτεάσης .

Η μέθοδος τελικά που επιλέγεται θα εξαρτηθεί από τους εξής σημαντικούς παράγοντες:

- Παρουσία μη πρωτεϊνικών παραγόντων στο ρυθμιστικό διάλυμα (sample ή lysis buffer)
- Η ταχύτητα και απλότητα διεκπεραίωσης της δοκιμασίας και της ανάλυσης των αποτελεσμάτων
- Το κόστος διεξαγωγής του πειράματος και αγοράς της μεθόδου
- Η ακρίβεια και η απαιτούμενη ευαισθησία (ικανότητα μέτρησης συγκέντρωσης)
- Η φύση της πρωτεΐνης που επιθυμούμε να μετρηθεί
- Τα μέσα που διαθέτει το εργαστήριο (π.χ ύπαρξη φασματοφωτόμετρου ή plate reader)

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών εκφράζεται με τους εξής τρόπους:

- Molarity: mol/L
- Amount/vol: mg/mL (mg/dL)
- % solution: 1% sol'n=1g/100mL
- Enzyme activity: $\frac{\mu\text{mol Product}}{(\text{min mL E})}$ ή SI 1 katal

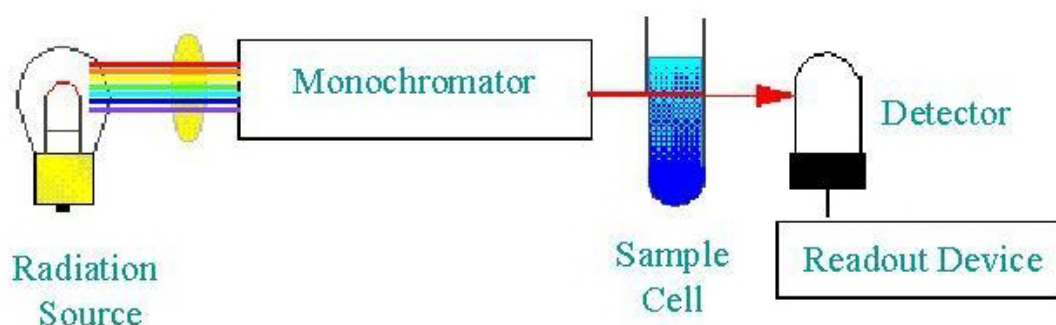
Το ζήτημα που προκύπτει αυτή την στιγμή είναι να καθοριστούν οι λόγοι οι οποίοι έχουν κάνει τον προσδιορισμό της συγκεντρώσεως των πρωτεϊνών ενός διαλύματος αναγκαία διαδικασία. Αρχικά καθορίζουν την συγκέντρωση σε μια αντίδραση, είτε αναφερόμαστε σε πρωτεϊνική συγκέντρωση, είτε σε πολυνουκλεοτίδια DNA ή RNA που εκφράζονται σε ug/mL ή σε molarity, είτε αναφερόμαστε σε ποσότητα ενζύμων που μετράται σύμφωνα με την ενζυμική δραστηριότητα. Η ακριβής ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών σε ένα δείγμα στο οποίο έχει γίνει η λύση των κυττάρων, μας επιτρέπει να γεμίσουμε κάθε well με την σωστή ποσότητα πρωτεΐνης. Έτσι αποφεύγεται η υπερφόρτωση κάθε well

καθιστώντας δυνατή την ανίχνευση πρωτεΐνης στο ενδιαφέρον δείγμα. Επιπρόσθετα, ορισμένες διαδικασίες που ακολουθούν μετέπειτα και αποσκοπούν στην περαιτέρω μελέτη των πρωτεϊνών απαιτούν τον καθορισμό της συγκέντρωσης της. Συγκεκριμένα ενδεικτικά κάποιες μέθοδοι είναι η SDS-PAGE(ηλεκτροφόρτιση:διαχωρισμός πρωτεϊνών ανάλογα με το μέγεθός τους), mass spectrometry(χαρακτηρισμός πρωτεϊνών), Edman's degradation (μέθοδος διαχωρισμού αμινοξέων μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας), Nuclear magnetic resonance(πληροφορίες για την δυναμική και δομή των πρωτεϊνών), ligand binding studies (σύνδεση ενός συνδέτη ligand με πρωτεΐνη στόχο).

Χρωματομετρικές μέθοδοι ποσοτικοποίησης συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Οι βασικές μέθοδοι καθορισμού της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης σε ένα διάλυμα είναι μέσω φασματοσκοπικές διαδικασίες και μέσω χρωματομετρίας. Προτού συνεχίσουμε με περαιτέρω ανάλυση συγκεκριμένων κατηγοριών για κάθε μέθοδο, είναι σκόπιμο να περιγράψουμε τα βασικά βήματα.

Φασματοσκοπικές διαδικασίες



Το φασματοφωτόμετρο είναι μία συσκευή που επινοήθηκε για τη μέτρηση της απορρόφησης. Μπορεί να παράγει μία δέσμη φωτός ενός δεδομένου μήκους κύματος, κατευθύνοντάς το σε ένα δείγμα (συνήθως σε διάλυμα μέσα σε μία κυψελίδα) και να μετρήσει την ένταση του μεταδιδόμενου φωτός. Για όλα αυτά απαιτούνται, μία πηγή φωτός, ένας μονοχρωμάτορας, η κυψελίδα με το δείγμα, ένας ανιχνευτής και μία οθόνη. Το φασματοφωτόμετρο δίνει τιμές % σε διαπερατότητα(T) και απορροφητικότητα(A).

Η διαπερατότητα είναι ένα μέγεθος που φανερώνει το μέτρο της ποσότητας του φωτός που μεταδίδεται μέσω του δείγματος. Όταν ένα δείγμα χαρακτηρίζεται από χαμηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών τότε η διαπερατότητα είναι μεγάλη. Ως απορροφητικότητα(A) ορίζεται η ποσότητα του φωτός που απορροφάται από το δείγμα. Εν αντιθέση με την διαπερατότητα, χαμηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών

$$\text{percent transmission} = \frac{I}{I_0} \times 100\%$$

I_0 = intensity of the light entering the sample

I = intensity of the light leaving the sample



δείγματος αντιστοιχεί σε χαμηλή απορροφητικότητα. Ισχύει $A = \log_{10}(1/T)$.

Με χρήση του νόμου του Beer-Lambert $A = \epsilon c L$, όπου c η συγκέντρωση του διαλύματος, ϵ ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της διαλυμένης ουσίας και L το μήκος της διαδρομής του φωτός, θεωρώντας σταθερά τα ϵ και L ($\epsilon \cdot L = k$) προκύπτει ότι $A = kc$.

Συνεπώς στις φασματοσκοπικές μεθόδους χρησιμοποιείται η ικανότητα της πρωτεΐνης (ή και μιας προσθετικής ομάδας) να απορροφάει φως σε μια συγκεκριμένη περιοχή UV του ορατού φάσματος. Πολύ σημαντικό επίσης είναι ότι με τις συγκεκριμένες μεθόδους δεν μετουσιώνονται οι πρωτεΐνες, δηλαδή δεν χάνουν την τρισδιάστατη δομή τους. Αυτό σημαίνει ότι οι δεσμοί μεταξύ των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων δεν σπάνε με συνέπεια η πρωτεΐνη να διατηρεί την λειτουργικότητά της.

Κάποια γενικά χαρακτηριστικά όλως των μεθόδων που θα αναλυθούν παρακάτω είναι:

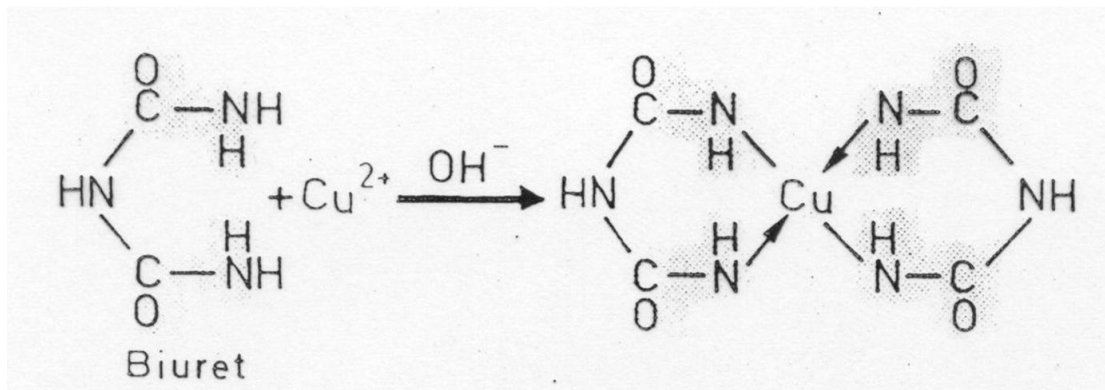
- Χρήση αντιδρατηρίου που αντιδρά με πρωτεΐνη και οδηγεί σε αλλαγή χρώματος
- Cu οξειδοαναγωγή ή δεσμευτική μπλε χρώση
- Μετουσίωση των πρωτεϊνών για να λάβουν την μέγιστη αλλαγή χρώματος.
- Μέθοδοι που εγκυμονούν κινδύνους για την υγεία άρα απαιτούνται υψηλά μέτρα προστασίας.

Ολοκληρώνοντας είναι σκόπιμο να επισημανθεί ότι με τις συγκεκριμένες μεθόδους, προσδιορίζεται η συνολική πρωτεΐνη στο διάλυμα σε mg/mL, άρα είναι χρήσιμες για ετερογενή μίγματα. Δεν είναι αναγκαίος ο καθαρισμός των δειγμάτων. Κάποιες μέθοδοι που θα αναλυθούν και παρακάτω όπως η A_{280} απαιτεί καθαρισμό του διαλύματος και ομογενή πρωτεϊνικά παρασκευάσματα.

Μεθόδους

Biuret Method

Η συγκεκριμένη μέθοδος συνιστά των «πατέρα» όλων των άλλων μεθόδων που ανακαλύφθηκαν στην συνέχεια και παραμένει η βάση για τις πολύ σημαντικές μεθόδους BCA και Lowry που θα αναλυθούν παρακάτω. Η αντίδραση Biuret βασίζεται ότι μόρια με δύο ή περισσότερους πεπτιδικούς δεσμούς αντιδρούν με ιόντα Cu^{2+} σε ένα αλκαλικό διάλυμα σχηματίζοντας ένα μωβ σύμπλοκο. Τα άτομα αζώτου των πεπτιδικών δεσμών σχηματίζουν ένα δεσμό συντόνισμού με το μεταλλικό ιόν. Η ποσότητα των συμπλοκών που σχηματίζονται είναι ανάλογη με τον αριθμό των πεπτιδικών δεσμών, αυτό οφείλεται ότι η αντίδραση Biuret λαμβάνει χώρα μόνο με την πλευρά των πεπτιδικών δεσμών και όχι με το υπόλοιπο μέρος του αμινοξέος.



Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης γίνεται χρησιμοποιώντας μια καμπύλη βαθμονόμησης που δημιουργείται με τη χρήση δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης. Η πρωτεΐνη που υποβλήθηκε σε επεξεργασία με αντιδραστήριο biuret μετράται σε 540 nm μετά από το πορφυρό προϊόν που σχηματίζεται.

Επειδή ο αριθμός των πεπτιδικών δεσμών ανά δεδομένο βάρος μονάδας είναι περίπου ίδιος για όλες τις πρωτεΐνες, αυτή η μέθοδος είναι γενικά εφαρμόσιμη και αρκετά ακριβή, ανεξάρτητα από τη σύνθεση του μίγματος πρωτεϊνών. Άλλα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι ότι ο χρόνος ανάπτυξης χρώματος είναι σχετικά σύντομος και η ένταση του χρώματος παραμένει σταθερή για ένα εύλογο χρονικό διάστημα (τουλάχιστον 30 λεπτά). Ένα σημαντικό μειονέκτημα αυτής της δοκιμασίας είναι η έλλειψη ευαισθησίας, το κατώτερο όριο είναι 2 mg πρωτεΐνης. Ένα άλλο μειονέκτημα είναι ότι μερικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο όπως το ρυθμιστικό διάλυμα Tris και το θειικό αμμώνιο, καθώς και ενδογενείς ενώσεις σε ακατέργαστα εκχυλίσματα, μπορεί να επηρεάσουν την ανάπτυξη του χρώματος.

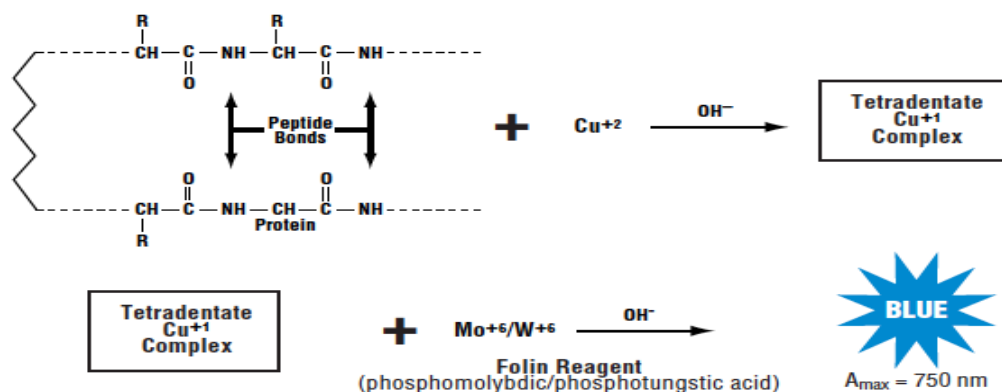
Η υλοποίηση του Biuret test είναι πολύ απλή. Το μόνο που έχει να κάνει κάποιος είναι να προσθέσει στο δείγμα ίδια ποσότητα από το αντιδραστήριο Biuret και να παρατηρήσει την αλλαγή χρώματος σε μωβ/lila προκειμένου να εντοπίσει την ύπαρξη πρωτεϊνών. Παρακάτω ακολουθεί ένα ενδιαφέρον video στο οποίο μπορείτε να δείτε εάν εντοπίζονται πρωτεΐνες σε ένα πιθανό πρωινό με γάλα, χυμό και φυστίκια.

<https://www.youtube.com/watch?v=ufec89A47uM>

Modified Lowry Protein Assay

Το 1951 Oliver H. Lowry εισήγαγε την συγκεκριμένη χρωματομετρική μέθοδο, προσφέροντας σημαντική βελτίωση σε σχέση με προηγούμενες δοκιμασίες. Το Modified Lowry Assay χρησιμοποιεί ένα σταθερό αντιδραστήριο που αντικαθιστά δύο ασταθείς αντιδραστήρια. Το Modified Lowry Assay είναι εύκολο να εκτελέσει επειδή οι επωάσεις γίνονται σε θερμοκρασία δωματίου και η δοκιμασία είναι αρκετά ευαίσθητη, επιτρέποντας την ανίχνευση της ολικής πρωτεΐνης σε χαμηλό εύρος (μικρογραμμάρια ανά χιλιοστόλιτρο). Ουσιαστικά το Modified Lowry Assay είναι μια ενισχυμένη δοκιμασία biuret συμπεριλαμβάνοντας τη χημεία αποσιδήρωσης χαλκού.

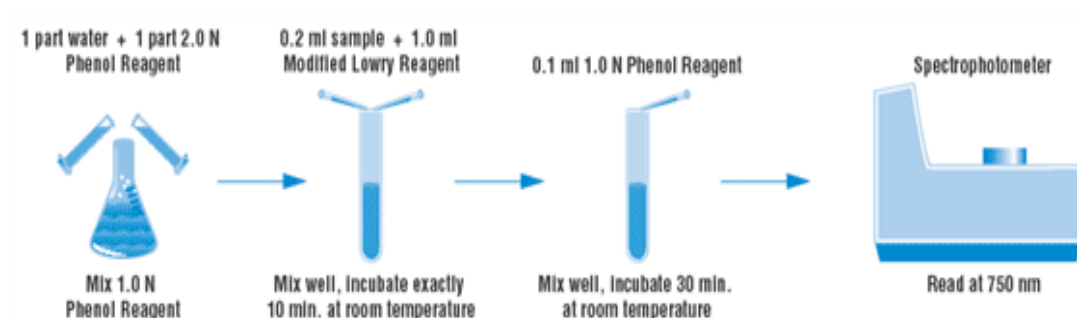
Κατά την συγκεκριμένη μέθοδο λαμβάνουν χώρα δύο αντιδράσεις. Αρχικά βασίζεται στην αναγωγή του χαλκού Cu^{2+} σε ιόντα χαλκού Cu^{+} σε αλκαλικό pH όταν αντιδρά με το πεπτίδιο. Έτσι δημιουργείται ένα σύμπλοκο Cu^{+} και πεπτιδίου που οφείλονται για την εμφάνιση του μωβ-μπλε χρώματος.



Στην συνέχεια όπως φαίνεται και στο παραπάνω σχήμα, ένα τετραόδοντο σύμπλοκο σχηματίζεται από 4 πεπτιδικούς δεσμούς και αφού προστεθεί το αντιδραστήριο Folin(arsenomolybdate reagent) σχηματίζεται το μπλε χρώμα. Ελεύθερα αμινοξέα τυροσίνης και τρυπτοφάνης δεσμεύουν ποσότητα από το Folin μειώνοντας της ποσότητά του στο δείγμα μας. Όπως στην αντίδραση biuret, μία καμπύλη βαθμονόμησης δημιουργείται και έτσι υπολογίζεται η συγκέντρωση της άγνωστης πρωτεΐνης.

Για μικρά πεπτίδια, η ποσότητα του χρώματος αυξάνει ανάλογα με το μέγεθος του πεπτιδίου. Η παρουσία οποιουδήποτε από τα παρακάτω πέντε αμινοξέα (τυροσίνη, τρυπτοφάνη, κυστεΐνη, ιστιδίνη και ασπαραγίνη) στο πεπτίδιο ενισχύουν περαιτέρω την ποσότητα του χρώματος που παράγεται. Με εξαίρεση την τυροσίνη και τρυπτοφάνη, ελεύθερα αμινοξέα δεν παράγουν έγχρωμο προϊόν με το Modified Lowry Assay. Εν απουσία οποιουδήποτε από τα πέντε αμινοξέα που παρατίθενται παραπάνω, πρωτεΐνες που περιέχουν υπολείμματα προλίνης έχουν χαμηλότερη απόκριση χρώματος με το Modified Lowry Assay λόγω της ικανότητας του συγκεκριμένου αμινοξέος να αντιδρά με σύμπλοκους σχηματισμούς.

Παρακάτω φαίνεται η διαδικασία υλοποίησης του πειράματος Lowry.



Κάποια από τα βασικά πλεονεκτήματα της παραπάνω μεθόδου είναι ότι το τελικό μπλε χρώμα που προκύπτει μετράται βέλτιστα σε μήκος κύματος 750nm αλλά μπορεί να μετρηθεί και μεταξύ 650-750nm έχοντας όμως κάποιες απώλειες στην ένταση του χρώματος. Η ένταση του φωτός που απορροφάται στα 750nm είναι ανάλογη της ποσότητας πρωτεϊνών στο δείγμα αλλά η χρωματική απόκριση της καμπύλης στο δείγμα είναι μη γραμμική. Η μέθοδος του Lowry είναι αρκετά ευαίσθητη ενώ το εύρος λειτουργίας της κυμαίνεται από 5-2000mg/mL.

Μειονέκτημα της μεθόδου είναι ο χρόνος πραγματοποίησής της ενώ είναι ευαίσθητη στην εμφάνιση κάποιων υλικών τα οποία μπορεί να αντιτίθενται στην ανάπτυξη χρώματος ή να παράγουν χρώμα από μόνες τους. (τριπτοφάη, τυροσίνη, οι περισσότερες φαινόλες, ξανθίνη, νουκλεϊκά οξέα, αιθανόλη, ακετόνη κ.α). Η ανάπτυξη του χρώματος είναι μια αργή διαδικασία και ξεθωριάζει γρήγορα, με αποτέλεσμα να απαιτούνται ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και γρήγορες και ακριβείς κινήσεις. Το παραπάνω γίνεται όλο και πιο δύσκολο όταν έχουμε να αναλύσουμε πολλά δείγματα.

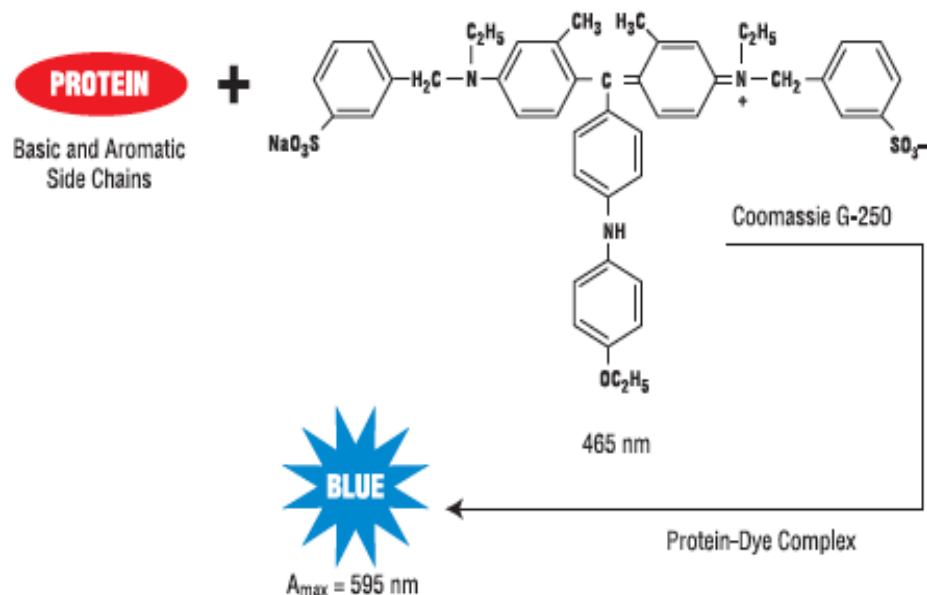
Το παρακάτω video είναι πολύ βοηθητικό για την κατανόηση της μεθόδου.

<https://www.youtube.com/watch?v=eVmFr4T93A>

Bradford Assays

Η χρήση του Coomassie G-250 Dye σε χρωματομετρική αντίδραση για την ποσοτικοποίηση της συνολικής πρωτεΐνης σε ένα δείγμα, χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Dr. Marion Bradford το 1976. Τόσο το Coomassie Protein Assay Kit όσο και το Coomassie Plus-The Better Bradford, αποτελούν βελτιωμένες τροποποιήσεις του αρχικού αντιδραστηρίου που χρησιμοποίησε ο Dr. Bradford.

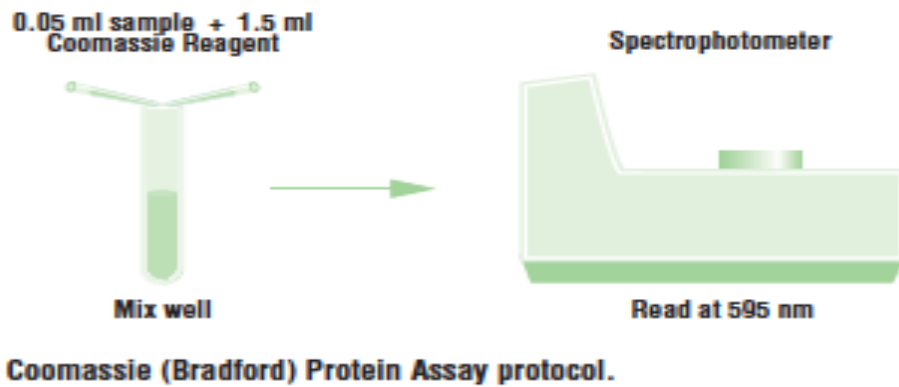
Στην συγκεκριμένη διαδικασία η χρωστική ουσία Coomassie G-250 διαλύεται σε ένα όξινο διάλυμα κάνοντάς το να απορροφήσει στα 465nm(καφεκόκκινο χρώμα). Την στιγμή που η βαφή, η οποία είναι αρνητικά φορτισμένη, συνδεθεί με τα θετικά φορτισμένα μόρια της πρωτεΐνης η απορρόφηση του διαλύματος φτάνει στα 595nm(μπλε). Η αλλαγή στην απορρόφηση είναι ανάλογη με την συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο διάλυμα.



Η ανάπτυξη του χρώματος με την χρωστική ουσία Coomassie, έχει συσχετιστεί με την παρουσία ορισμένων αμινοξέων(κυρίως αργινίνη, λυσίνη και ιστιδίνη) στην πρωτεΐνη. Δυνάμεις Van der Waals και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις συμμετέχουν στην σύνδεση της χρωστικής ουσίας με τις πρωτεΐνες. Ανάλογα με το πόσα θετικά μόρια αμινοξέων υπάρχουν στις πρωτεΐνες, με αυτά συνδέεται η χρωστική ουσία. Τα ελεύθερα αμινοξέα και γενικά πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους δεν παράγουν χρώμα όταν χρησιμοποιούμε τέτοια αντιδραστήρια βαφής. Η μάζα της πρωτεΐνης θα πρέπει να ξεπερνάει τα 3000 daltons προκειμένου να είναι δυνατή η αντίδραση.

Η μέθοδος Bradford είναι γρήγορη, σχετικά φθηνή, με υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια ενώ δεν χρειάζεται ιδιαίτερος εξοπλισμός και το πείραμα εκτυλίσσεται σε θερμοκρασία δωματίου. Γενικά και για τις δύο μεθόδους Coomassie (Bradford) Protein Assay και The Coomassie Plus – The Better Bradford™ Assay, το δείγμα προστίθεται στο δοκιμαστικό σωλήνα που εμπεριέχει το αντιδραστήριο και έπειτα από μια σύντομη επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, μετράται το μπλε χρώμα στα 595nm.

Βασικό μειονέκτημα της συγκεκριμένης δοκιμασίας είναι η ασυμβατότητα με επιφανειοδραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στην διαλυτοποίηση των μεμβρανών των πρωτεϊνών. Η ύπαρξη μιας επιφανειοδραστικής ουσίας παρουσιάζει καθίζηση του αντιδραστηρίου της χρωστικής ουσίας. Βέβαιη η Novexin έχει αναπτύξει ένα απορρυπαντικό το Bradford Ultra, το οποίο καταργεί την προαπαιτήση το αντιδραστήριο να καθιζάνει πριν από την χρήση του. Επιπλέον λόγω του όξινου πειριβάλλοντος του αντιδραστηρίου, ένας μικρός αριθμός πρωτεϊνών που έχει κακή διαλυτότητα στο συγκεκριμένο περιβάλλον είναι δύσκολο να προσδιοριστεί. Η ουσία Coomassie χρωματίζει τις γυάλινες κυψελίδες στις οποίες βρίσκονται τα δείγματα όταν εισέρχονται στο φασματοφωτόμετρο προκειμένου να μετρηθεί η ένταση του χρώματος.



Τέλος, η καμπύλη απορρόφησης-συγκέντρωσης είναι μη γραμμική(η The Coomassie Plus – The Better Bradford™ Assay παρουσιάζει μεγαλύτερη γραμμικότητα). Όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα για το Coomassie(Bradford) Protein Assay η καμπύλη του BSA (αλβουμίνη βόειου ορού) είναι μη γραμμική ενώ όταν χρησιμοποιώ το BGG(βόειο γάμμα σφαιρίνης) τείνει να γραμμικοποιηθεί.

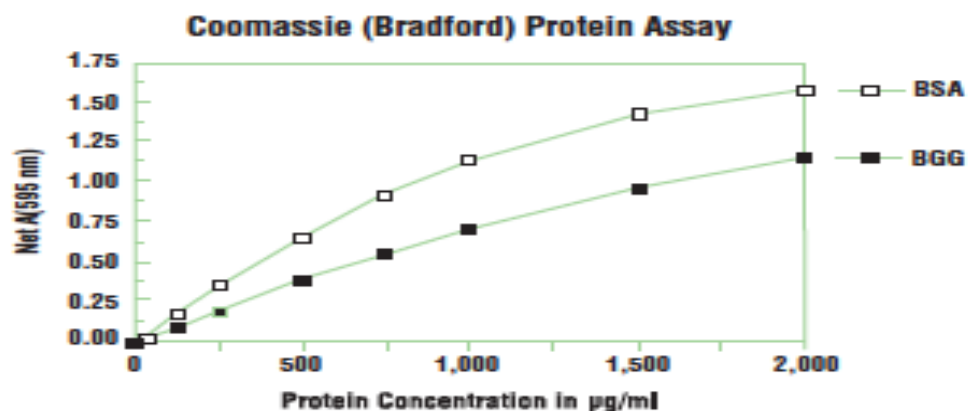
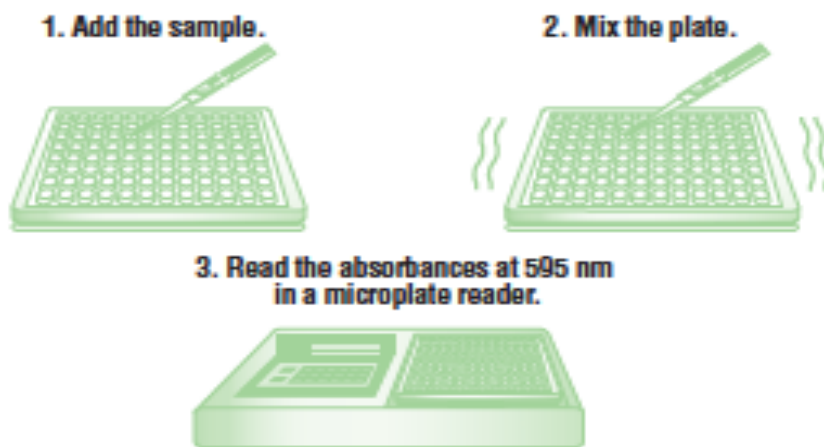


Figure 3. Color response curves obtained with Coomassie (Bradford) Protein Assay using bovine serum albumin (BSA) and bovine gamma globulin (BGG). The standard tube protocol was performed and the color was measured at 595 nm.

Παρακάτω παρατίθενται ορισμένα πλεονεκτήματα του The Coomassie Plus – The Better Bradford™ Assay το οποίο προσφέρει υψηλότερη ακρίβεια συγκριτικά με το συμβατικό πακέτο. Γενικά είναι ότι καλύτερο κυκλοφορεί στην αγορά γιατί μεθόδους Bradford.

- Ευκολότερη και ταχύτερη προετοιμασία. Το αντιδραστήριο είναι έτοιμο προς χρήση χωρίς να απαιτείται κουραστικές αραιώσεις, διηθήσεις ενώ δεν λερώνει
- Σημαντικά χαμηλότερο κόστος για κάθε δοκιμασία.
- Γρηγορότερη δοκιμασία που δεν υπερβαίνει τα 10 λεπτά
- Πιο ακριβή αποτελέσματα με αυξημένη γραμμικότητα της απόκριση

Τέλος ένα παρακλάδι της μεθόδου Bradford είναι η Coomassie Dry Protein Assay Plates(Χρώση στεγνής δοκιμασίας πρωτεϊνών σε πλάκες). Χρησιμοποιείται για ανάλυση μεγάλου όγκου δειγμάτων, απλοποιώντας την διαδικασία καθορισμού συγκέντρωσης των πρωτεϊνών.



Coomassie Dry Protein Assay Plates protocol.

Παρακάτω φαίνεται ένα πολύ ενδιαφέρον video από μια μέθοδο Bradford στην οποία στόχος είναι ο καθορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών από ένα δείγμα γάλατος.

<https://www.youtube.com/watch?v=vfY3mVOIGBU>

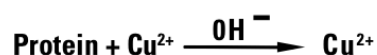
BCA Protein Assay – Micro BCA

Το 1985, ο Paul K. Smith, εισήγαγε μία καινούργια μέθοδο για ανίχνευση των πρωτεϊνών την μέθοδο BCA Protein Assay. Από τότε έχει γίνει η πιο δημοφιλής μέθοδος για χρωματομετρική ανίχνευση και ποσοτικό προσδιορισμό της πρωτεΐνης.

Το BCA Protein Assay έχει ένα μοναδικό πλεονέκτημα σε σχέση με τις άλλες μεθόδους. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε δείγματα που περιέχουν έως 5% τασιενεργά (απορρυπαντικά).

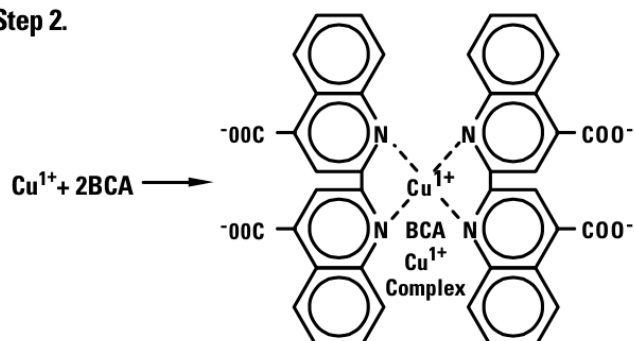
Η διαδικασία που ακολουθείται εν συντομία στη μέθοδο BCA Protein Assay είναι: το δείγμα προστίθεται στο σωλήνα ή πλάκα που περιέχει το παρασκευασμένο BCA και μετά από επώαση 30 λεπτών στους 37 ° C και ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου, το προκύπτον πορφυρό χρώμα μετράται στα 562 nm. Το πρωτόκολλο είναι παρόμοιο για το Micro BCA Protein Assay, εκτός του ότι η αναλογία του όγκου του δείγματος προς αντιδραστήριο εργασίας είναι διαφορετική και οι σωλήνες επωάζονται για 60 λεπτά στους 60 ° C.

Step 1.



Το BCA Protein Assay συνδυάζει τη γνωστή αναγωγή του Cu^{2+} στο Cu^{1+} με πρωτεΐνη σε αλκαλικό περιβάλλον με την εξαιρετικά ευαίσθητη και επιλεκτική χρωματομετρική ανίχνευση του

Step 2.



χαλκού κατιόντος (Cu^{1+}) με δικιγchonινικού οξέος (Σχήμα 1). Το πρώτο βήμα είναι η χηλική ένωση του χαλκού με την πρωτεΐνη σε ένα αλκαλικό περιβάλλον για να σχηματίσει ένα μπλε χρωματισμένο σύμπλοκο. Σε αυτή την αντίδραση, γνωστή ως αντίδραση διουρίας, πεπτίδια που περιέχουν τρία ή περισσότερα υπολείμματα αμινοξέων σχηματίζουν ένα έγχρωμο σύμπλοκο με ιόντα χαλκού σε ένα αλκαλικό περιβάλλον που περιέχει τρυγικό κάλιο νάτριο. Αυτό έγινε γνωστό ως διουρία αντίδραση, λόγω της ομοιότητας της πολύπλοκης μορφής της οργανικής ένωσης της διουρίας ($\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$) και του ιόντος χαλκού. Η Διουρία, ένα προϊόν της περίσσειας ουρίας και της θερμότητας, αντιδρά με το χαλκό προς σχηματισμό ενός συμπλόκου μπλε φως τετρασχιδής (Σχήμα 2). Ενιαία αμινοξέα και διπεπτίδια δεν δίνουν την αντίδραση διουρίας, αλλά τρι-πεπτίδια και μεγαλύτερα πολυπεπτίδια ή πρωτεΐνες που θα αντιδράσουν για να παράγουν το μπλε φως σε βιολετί που απορροφά το φως στα 540nm. Ένα ιόν χαλκού σχηματίζει ένα έγχρωμο σύμπλοκο με έξι παρα τέσσερα πεπτιδικούς δεσμούς.

Η ένταση του χρώματος που παράγεται είναι ανάλογη με τον αριθμό των πεπτιδικών δεσμών που συμμετέχουν στην αντίδραση. Έτσι, η αντίδραση διουρίας είναι η βάση για μια απλή και γρήγορη χρωματομετρική αντίδραση με το ίδιο όνομα για τον ποσοτικό προσδιορισμό ολικής της πρωτεΐνης και τον δείκτη συγκέντρωσης της.

Δεδομένου ότι η περιοχή εργασίας για τον προσδιορισμό διουρίας είναι από 5 έως 160 mg / mL, ο προσδιορισμός διουρίας χρησιμοποιείται σε κλινικά εργαστήρια για την ποσοτικοποίηση της συνολικής πρωτεΐνης στον ορό.

Στο δεύτερο στάδιο της χρωματικής αντίδρασης, το BCA, ένα εξαιρετικά ευαίσθητο και επιλεκτικό αντιδραστήριο αντιδρά με το χαλκό κατιόν (Cu^{1+}) που σχηματίστηκε

στο βήμα 1. Το πορφυρού χρώματος προϊόν αντίδρασης σχηματίζεται με τη χήλωση δύο μορίων του BCA με ένα ιόν χαλκού (Σχήμα 1). Το BCA / σύμπλεγμα χαλκού είναι υδατοδιαλυτό και εμφανίζει μια ισχυρή γραμμική απορρόφηση στα 562 nm με αυξανόμενες συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης. Το πορφυρό χρώμα μπορεί να μετρηθεί σε κάθε μήκος κύματος μεταξύ 550-570nm με ελάχιστη (λιγότερο από 10%) απώλεια του σήματος. Το BCA είναι περίπου 100 φορές πιο ευαίσθητο (κατώτερο όριο ανίχνευσης) από το αντιδραστήριο διουρίας. Η αντίδραση που οδηγεί στην αλλαγή χρώματος του BCA, ως αποτέλεσμα της μείωσης του Cu^{2+} + επηρεάζεται επίσης έντονα από την παρουσία οποιουδήποτε από τέσσερα υπολείμματα αμινοξέων (κυστεΐνη ή κυστίνη, τυροσίνη, και τρυπτοφάνη) στην αλληλουχία αμινοξέων της πρωτεΐνης.

Το ποσοστό του BCA που θα αλλάξει χρώμα εξαρτάται από την θερμοκρασία θερμοκοιτίδες, τα είδη της πρωτεΐνης στο δείγμα και τις σχετικές ποσότητες των αντιδραστικών αμινοξέων που περιέχονται στις πρωτεΐνες. Οι περίοδοι επώασης επιλέχθηκαν για να δώσουν την μέγιστη αλλαγή χρώματος σε ένα εύλογο χρονικό διάστημα.

Πλεονεκτήματα της BCA Protein Assay

Το κύριο πλεονέκτημα του BCA Protein Assay είναι ότι τα περισσότερα επιφανειοδραστικά (ακόμη και αν είναι παρούσα στο δείγμα σε συγκεντρώσεις μέχρι και 5%) είναι συμβατά. Η μεταβολή της πρωτεΐνης στην ποσότητα του

χρώματος που παράγεται με την BCA Protein Assay είναι σχετικά χαμηλή, παρόμοια με εκείνη που παρατηρήθηκε στη μέθοδο Lowry Protein Assay.

Το BCA Protein Assay παράγει μια γραμμική καμπύλη απόκρισης ($r^2 > 0.95$) και είναι διαθέσιμο σε δύο συνθέσεις με βάση το δυναμικό εύρος που απαιτείται για την ανίχνευση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης ενός άγνωστου δείγματος. Το BCA Protein Assay ανιχνεύει συγκεντρώσεις πρωτεΐνης από 20 έως 2,000 $\mu\text{g} / \text{mL}$ και απαιτεί αντιδραστήριο A (ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει ανθρακικό BCA αντιδραστήριου) και B αντιδραστήριου (διάλυμα θειικού χαλκού). Ένα διάλυμα εργασίας (WS) παρασκευάζεται με ανάμιξη 50 μερών του BCA αντιδραστήριου A με 1 μέρος του BCA αντιδραστήριου B (50: 1, Αντιδραστήριο A: B). Το διάλυμα εργασίας έχει πράσινο χρώμα που μετατρέπεται πορφυρό μετά από 30 λεπτά στους 37 ° C υπό την παρουσία πρωτεΐνης. Η αναλογία του δείγματος σε WS χρησιμοποιείται είναι 1:20. Το Micro BCA Protein Assay (Σχήμα 4) είναι πιο ευαίσθητη μέθοδος και έχει ένα στενότερο δυναμικό εύρος 0.1-25 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Για την προετοιμασία του Micro BCA WS, τρία αντιδραστήρια (A, B και C) αναμιγνύονται μαζί σε μία αναλογία 25 μερών Micro Αντιδραστήριο A έως 24 μέρη Micro Αντιδραστήριο B και 1 μέρος Micro Αντιδραστήριο C. Το Micro BCA WS αναμιγνύεται με το δείγμα ή πρότυπο σε αναλογία 1: 1 όγκο. Το πορφυρό χρώμα απάντηση διαβάζεται στα 562 nm μετά 1 ώρα στους 60 ° C.

Δεδομένου ότι η αντίδραση χρώματος δεν είναι μια πραγματική αντίδραση, η μέγιστη δυνατή ευελιξία πρωτοκόλλου επιτρέπεται με τη δοκιμασία πρωτεΐνης BCA. Με αύξηση της θερμοκρασίας επώασης, η ευαισθησία του ποσοτικού προσδιορισμού μπορεί να αυξηθεί. Η βελτιωμένη μέθοδος του BCA απαιτεί επώαση στους 60 ° C για 30 λεπτά, συνεπώς η περιοχή εργασίας για τον προσδιορισμό μετατοπίζεται προς 5-250 $\mu\text{g} / \text{mL}$ και το ελάχιστο επίπεδο ανίχνευσης γίνεται 5 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

Η μέθοδος BCA απαιτεί λιγότερη πρωτεΐνη καθώς η πρωτεΐνη χρωματίζεται ευκολότερα. Σε γενικές γραμμές, η μέθοδος BCA Protein Assay παρέχει μία από τις πιο ακριβείς μετρήσεις της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης σε βιολογικά δείγματα και είναι απλό να εκτελέσει.

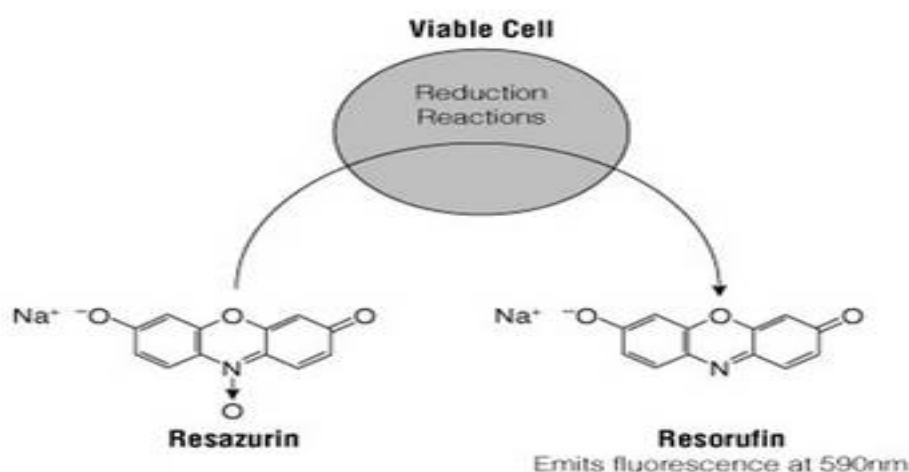
Μειονεκτήματα της BCA Protein Assay

Οι ουσίες που μειώνουν τον χαλκό θα παράγουν επίσης το χρώμα του BCA, επηρεάζοντας έτσι την ακρίβεια της ποσοτικοποίησης της πρωτεΐνης. Τα αντιδραστήρια που αποσιδερώνουν τον χαλκό παρεμβαίνουν επίσης με τη μείωση της ποσότητας του χρώματος BCA που παράγεται. Ορισμένα μεμονωμένα αμινοξέα (κυστεΐνη ή κυστίνη, τυροσίνη και τρυπτοφάνη) παράγουν επίσης το χρώμα και επηρεάζουν τα αποτελέσματα.

https://www.youtube.com/watch?v=3_BOX6nRey8

Resazurin protocol

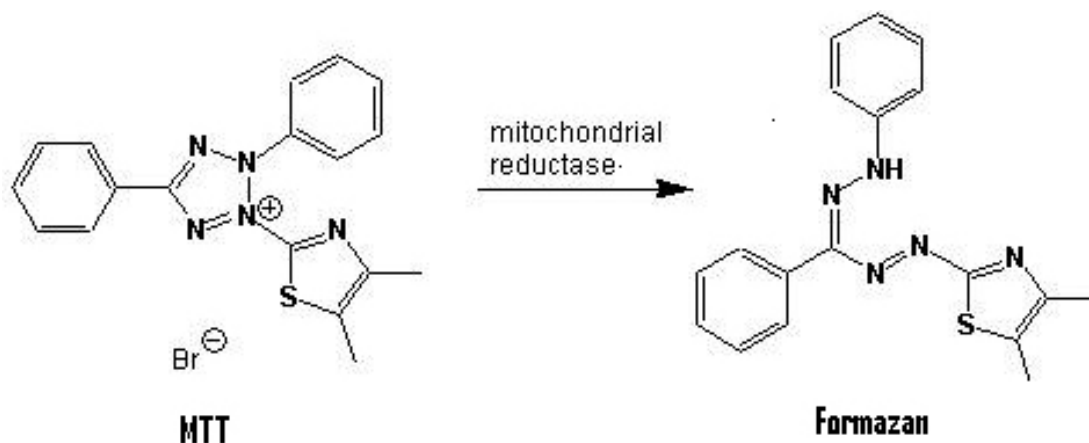
Με την συγκεκριμένη μέθοδο μπορούμε να προσδιορίσουμε τον αριθμό των πρωτεϊνών σε βιώσιμα κύτταρα, γνωρίζοντας τον μέσο αριθμό πρωτεϊνών που φέρουν τα κύτταρα της καλλιέργειάς μας. Η ρεσαζουρίνη μπορεί να διαλυθεί σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα αποκτώντας ένα μπλε χρώμα και στην συνέχεια να προστεθεί απευθείας στα κύτταρα της καλλιέργειάς μας. Τα βιώσιμα κύτταρα μετατρέπουν την ρεσαζουρίνη σε ρεσορουφίνη η οποία έχει χρώμα ροζ και φθορίζουν. Μετρώντας σε ένα φασματοφωτόμετρο την αλλαγή χρώματος βρίσκουμε τα επίπεδα των πρωτεϊνών.



Γενικά αποτελεί μια φθηνή και σχετικά ευαίσθητη μέθοδο ενώ μεγάλο της πλεονέκτημα είναι ότι δεν απαιτείται λύση των κυττάρων. Παρόλα αυτά επηρεάζεται από ουσίες που παρεμβάλλουν την απορρόφηση του φωτός και έχει μεγάλο χρόνο επώασης.

MTT Protocol

Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει πολλά κοινά σημεία με το resazurin protocol και βασική της λειτουργία είναι ο προσδιορισμός των βιώσιμων κυττάρων. Γενικά έχει μικρό κόστος και δεν επηρεάζεται άμεσα από παρεμβάλλουσες ουσίες όπως η resazurin. Το κίτρινου χρώματος διάλυμα MTT ανάγεται σε μωβ φορμαζάνη στα μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων. Η απορρόφηση του χρώματος μπορεί να ποσοτικοποιηθεί σε μέτρηση ενός συγκεκριμένου μήκους κύματος στο φασματοφωτόμετρο. Γενικά χρησιμοποιείται για δείγματα σε συγκέντρωση από 0,2-0,5 mg/ml και απαιτείται επώαση από 1 έως και 4 ώρες.



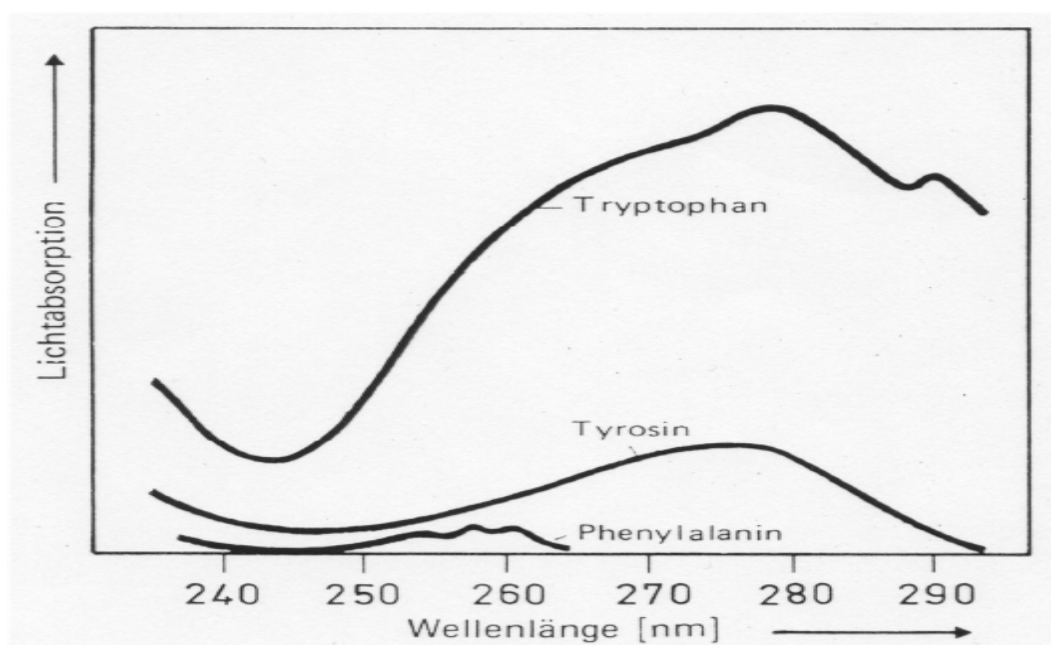
Η χρήση της μεθόδου MTT έχει περιορισμούς και επηρεάζεται από: (1) τη φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων και (2) διακύμανση στη μιτοχονδριακή δραστηριότητα της αφυδρογονάσης σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Παρ' όλα αυτά, η μέθοδος MTT είναι χρήσιμη στην μέτρηση της κυτταρικής ανάπτυξης σε απόκριση προς μιτογόνα, αντιγονικά ερεθίσματα, παράγοντες ανάπτυξης και άλλα αντιδραστήρια που προωθούν την κυτταρική ανάπτυξη, μελέτες κυτταροτοξικότητας, και την κατασκευή των καμπυλών ανάπτυξης των κυττάρων.

UV Απορρόφηση

Ένας μεγάλο πλήθος μεθόδων ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης σε ένα δείγμα βασίζεται στην UV ορατή φασματοσκοπία. Αυτές οι μέθοδοι βασίζονται στην φυσική ιδιότητα των πρωτεϊνών να απορροφούν φως στην UV ορατή περιοχή τους φάσματος ή έπειτα από επεξεργασία τους με χημικούς και φυσικούς τρόπους να τις κάνουμε να αποκτούν την συγκεκριμένη ιδιότητα. Αρχικά μια καμπύλη βαθμονόμησης απορροφητικότητας παρασκευάζεται χρησιμοποιώντας μια σειρά πρωτεϊνικών διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης. Η απορρόφηση του διαλύματος αναλύεται και μετράται στο ίδιο μήκος κύματος και η αντίστοιχη συγκέντρωση καθορίζεται από την καμπύλη βαθμονόμησης.

Μέτρηση στα 280nm

Για πρωτεΐνες που δεν περιέχουν μια προσθετική ομάδα απορρόφησης (αίμη, φλαβίνη κ.α) η μέθοδος A280 καθιστά μια ποσοτική μέθοδο προσδιορισμού της πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας τις απορροφητικές ιδιότητες των ειδικών αμινοξέων. Συγκεκριμένα η τρυπτοφάνη και η τυροσίνη απορροφούν υπεριώδες φως έντονα στα 280nm. Η περιεκτικότητα σε τρυπτοφάνη (Trp) και τυροσίνη (Try) σε πολλές πρωτεΐνες παραμένει σταθερή οπότε η απορρόφηση των διαλυμάτων μπορεί να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας τις απορροφήσεις των ειδικών αυτών αμινοξέων. Όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα η απορροφητικότητα των ειδικών αυτών αμινοξέων καθορίζεται ανάλογα με το μήκος κύματος στο οποίο λειτουργεί το φασματοφωτόμετρό μας.



Η απορρόφηση που μετρήθηκε στα 280nm (A_{280}) χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με σύγκριση με μια πρότυπη απορροφητικότητα ϵ_{280} για την εν λόγω πρωτεΐνη. Η σχέση που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της πρωτεΐνης είναι:

$$\epsilon_{280 \text{ nm}} (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}) = (\# \text{Trp})(5500) + (\# \text{Tyr})(1490) + (\# \text{Cys})(125)$$

Όπου οι αριθμοί για την Trp, Tyr και Cys προκύπτουν από το παρακάτω πίνακα:

AA	$\epsilon_{280} (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$	% total ϵ_{280}
Trp	5500	77.3
Tyr	1490	21
Cys	125	1.8

Έτσι λοιπόν όταν είναι γνωστή η ϵ_{280} υπολογίζω την άγνωστη συγκέντρωση του δείγματος χρησιμοποιώντας την απορρόφηση A_{280} . Από τον τύπο

$$\text{Prot. conc (mg/ml)} = \frac{A_{280}}{\epsilon_{280} \times b}$$

όπου η απορρόφηση A_{280} μετράται σε ml/mg cm και b είναι το μήκος της διαδρομής σε cm. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης μιγμάτων από 20-3000μg/ml.

Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι η υψηλή ευαισθησία της, η ευκολία διεξαγωγής της και το γεγονός ότι δεν καταστρέφει τα δείγματα εν αντιθέση με άλλες χρωματομετρικές μεθόδους. Τα μειονεκτήματά της είναι ότι

τα δείγματα πρέπει να είναι καθαρά, ενώ είναι απαραίτητη η γνώση των πόσων αμινοξέων βρίσκονται στο δείγμα. Τέλος μειονέκτημα αποτελεί και το γεγονός ότι απαιτείται η κατοχή φασματοφωτόμετρου UV. Το video παρακάτω αποτυπώνει μια διαδικασία A_{280} με χρήση ενός σύγχρονου φασματοφωτόμετρου.

<https://www.youtube.com/watch?v=OEKYYiSoEFc>

Μέτρηση στα A_{205}

Αντίστοιχα με την μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεϊνών ενός δείγματος στο 280nm υπάρχει και ο καθορισμός της συγκέντρωσης στα 205nm που βασίζεται στην απορρόφηση των πεπτιδικών δεσμών. Η συγκεκριμένη μέτρηση χρησιμοποιείται για έυρος από 1-100 ug/ml πρωτεΐνης. Έτσι λοιπόν υπάρχουν δύο σενάρια:

Εάν είναι γνωστή η απορροφητικότητα A_{205} της πρωτεΐνης χρησιμοποιώ την εξίσωση για να βρω την απορροφητικότητα από την πρότυπη καμπύλη. Από την άλλη εάν το ϵ_{205} δεν είναι γνωστό, μετράω την απορροφητικότητα με ένα φασματοφωτόμετρο και χρησιμοποιώ την παρακάτω εξίσωση για να βρω την συγκέντρωση πρωτεϊνών του δείγματός μου.

$$\text{concentration (mg/ml)} = \frac{A_{205}}{31 \times b}$$

Φθορισμός

Αξιοποιώντας τον ενδογενή φθορισμό τον οποίο και εκπέμπουν κάποια αρωματικά αμινοξέα όπως η τρυπτοφάνη, η τυροσίνη και η φαινυλαλανίνη, μπορούμε να προβούμε στον καθορισμό της συγκέντρωσης πρωτεϊνών ενός δείγματος. Αντίστοιχα με την απορροφητικότητα αυτών των στοιχείων που μετράται εύκολα από καμπύλες, έτσι και ο φθορισμός μπορεί να υπολογιστεί. Η συγκεκριμένη διαδικασία χρησιμοποιείται για συγκεντρώσεις από 5-50 ug/ml. Όπως είναι εμφανές από τον παρακάτω πίνακα φαίνεται η απορροφητικότητα και ο φθορισμός των τριών αμινοξέων που εισέρχονται στις αντίστοιχες εξισώσεις και οδηγούν στην εύρεση της συγκέντρωσης.

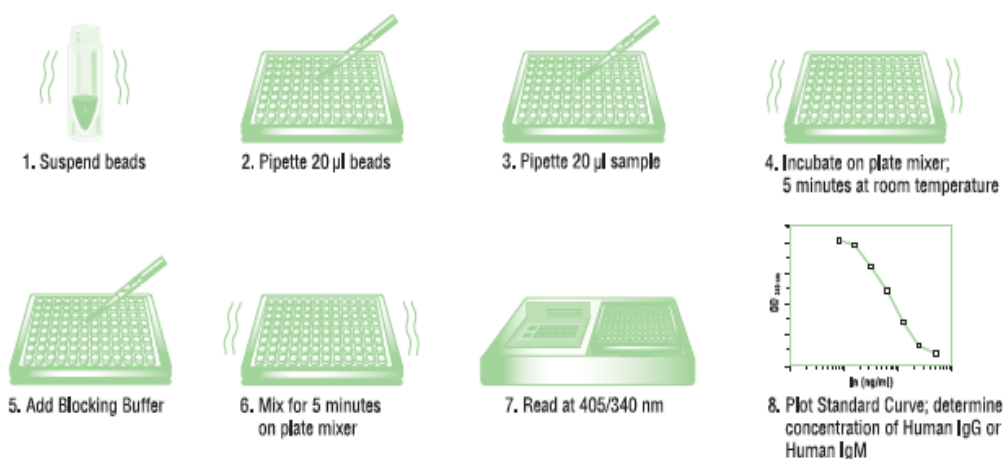
	<i>Lifetime</i>	<i>Absorption</i>		<i>Fluorescence</i>	
		Wavelength	Absorptivity	Wavelength	Quantum
Tryptophan	2.6	280	5,600	348	0.20
Tyrosine	3.6	274	1,400	303	0.14
Phenylalanine	6.4	257	200	282	0.04

Ειδικές μεθόδους

Παρακάτω παρουσιάζονται εν συντομία ειδικές μεθόδους προσδιορισμού της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών ενός δείγματος, αξιοποιώντας κάποια χαρακτηριστικά των αμινοξέων αλλά και συγκεκριμένες χημικές αντιδράσεις.

- Easy-Titer® IgG and IgM Assay Kits

Συνιστά τον γρηγορότερο και ευκολότερο τρόπο για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αντισωμάτων. Η όλη διαδικασία μπορεί να διαρκέσει μόλις 30 λεπτά και απαλλάσσει τους βιολόγους από την χρήση φασματοφωτομετρικών ή χρωματομετρικών μεθόδων. Επιπρόσθετα είναι δυνατόν να αποφευχθεί η κουραστική και χρονοβόρα διαδικασία ELISA για τον προσδιορισμό του τίτλου του αντισώματος. Το συγκεκριμένο αντιδραστήριο δεν αντιδρά με αντισώματα άλλων ειδών (πχ βοοειδή) που δεν μας ενδιαφέρουν ενώ παράλληλα επιτρέπεται η μέτρηση της IgG (immunoglobulin) από διάφορους τύπους δειγμάτων όπως καλλιέργεια και σωματικά υγρά χωρίς να απαιτείται καθαρισμός τους από άλλες προσμίξεις.



Easy-Titer® IgG and IgM Assay Kit protocol. A simple assay makes for an easy-to-perform assay protocol. Easy-Titer® IgG Assay Kits feature a simple procedure that reduces hands-on time and requires fewer steps that lead to more reproducible results. The entire process can be completed easily in about 30 minutes.

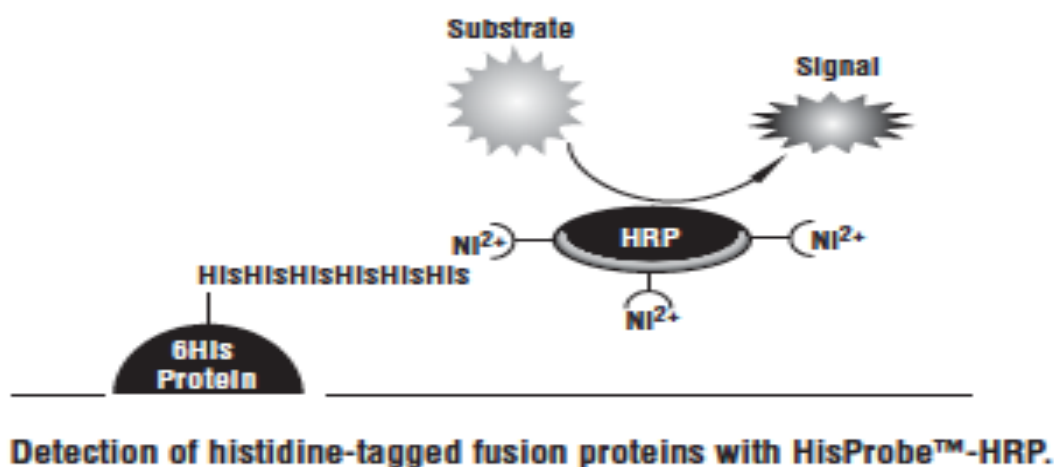
- Glycoprotein Carbohydrate Estimation Kit

Άμεση προσέγγιση της περιεκτικότητας μιας πρωτεΐνης σε υδατάνθρακες. Συγκεκριμένα επιτρέπει την εύκολη και γρήγορη διάγνωση ενός αγνώστου πρωτεϊνικού δείγματος ως γλυκοπρωτεΐνη και στην συνέχεια υπολογίζει την περιεκτικότητα επι τοις εκατό σε υδατάνθρακες φέροντάς το σε αντίθεση με έναν πρότυπο γνωστό γλυκοπρωτεϊνών με γνωστή περιεκτικότητα υδατανθράκων. Είναι ένας συμπληρωματικός τρόπος για την ηλεκτροφόρηση και ELISA.

- Histidine-Tagged Protein Detection

Το HisProbe™-HRP Western blotting probe εκμεταλλεύεται την συγγένεια της

ιστιδίνης για το κατιόν Ni^{2+} . Το συγκεκριμένο προϊόν έχει βελτιστοποιηθεί για την άμεση ανίχνευση της επισυναπτόμενης ανασυνδυασμένης ιστιδίνης ή και πρωτεϊνών πλούσιες σε ιστιδίνη. Ο ενεργός κρίκος είναι το χηλικό τριοδοντικό που επιτρέπει στο Ni^{2+} να βρίσκεται σε ενεργή μορφή για την ανίχνευση των μορίων στόχων.



Πειραματική Διαδικασία BCA Assay στο εργαστήριο Βιοϊατρικής

Η διεκπεραίωση της δοκιμασίας BCA πραγματοποιήθηκε σε δύο συναντήσεις με τους υπεθύνους των εργαστηρίων Εμβιομηχανικής και Βιοϊατρικής Τεχνολογίας του ΕΜΠ στο κτίριο Μ. Στην πρώτη συνάντηση έγινε μια εισαγωγή του πειράματος και μαζί με κάποια σχέδια που θα αποτελούσαν τον οδηγό μας στην διεξαγωγή του BCA assay, έγινε και μια πρώτη εξοικείωση με τα όργανα που θα χρησιμοποιήσουμε. Στην δεύτερη συνάντηση ξεκινήσαμε την διεξαγωγή του πειράματος όπου η Ελιάνα Ζαχαροπούλου ανέλαβε την 2-fold αραιώση ενώ ο Κωνσταντίνος Δαβιλάς την 3-fold.

Είναι σκόπιμη μια πρώτη εισαγωγή σε βασικά διαλύματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν είτε για τις αραιώσεις είτε για τις αντιδράσεις του πειράματος.

PBS: Αλατόνερο ρυθμισμένο με φωσφορικό (εν συντομία PBS) είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται συνήθως στη βιολογική έρευνα. Είναι ένα διάλυμα άλατος με βάση το νερό που περιέχει φωσφορικό νάτριο, χλωριούχο νάτριο και, σε ορισμένες συνθέσεις, χλωριούχο κάλιο και φωσφορικό κάλιο. Η ωσμωγραμμομοριακότητα και ιόντα συγκεντρώσεις των διαλυμάτων ταιριάζουν με εκείνα του ανθρώπινου σώματος. Χρησιμοποιείται στην αραιώση.

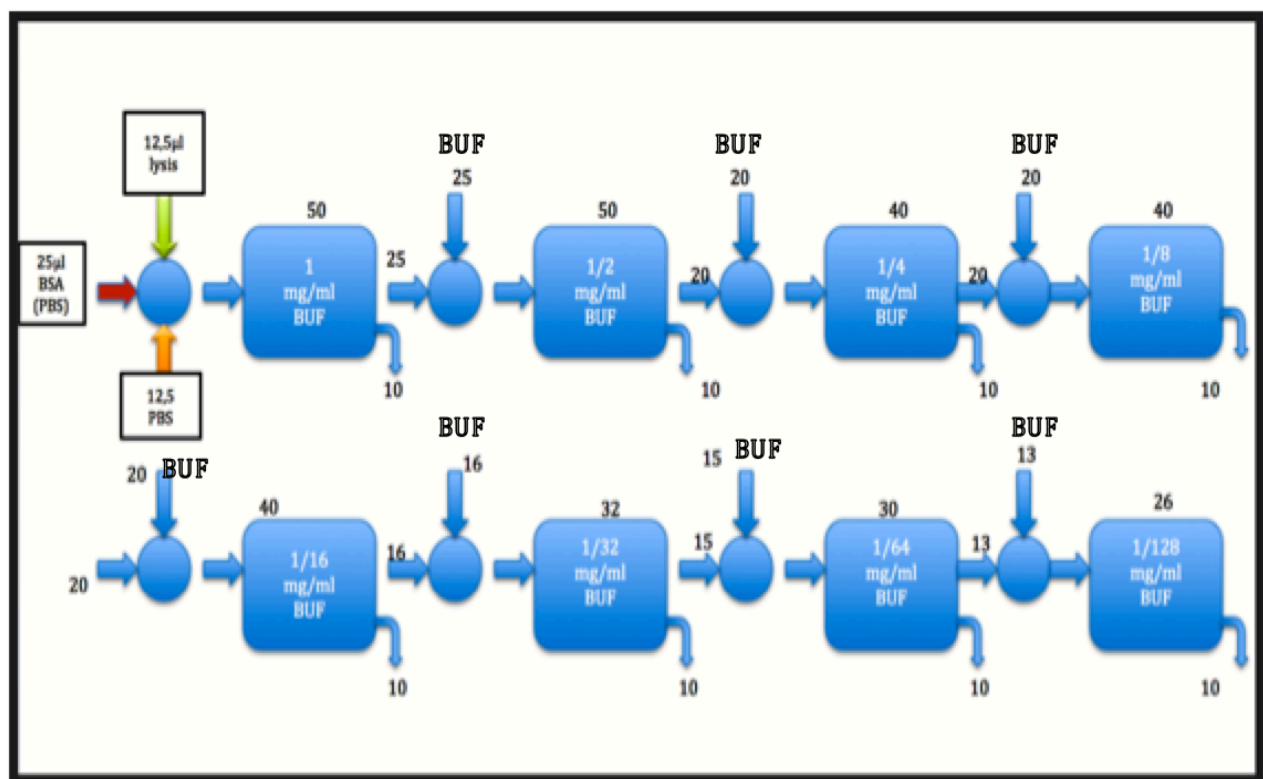
BSA(Αλβουμίνη βόειου ορού): Ρυθμιστική πρωτεΐνη προερχόμενη από βοειδή που χρησιμοποιείται ως πρότυπο συγκέντρωσης σε εργαστηριακά πειράματα. Το συγκεκριμένο kit του εργαστηρίου είχε συγκέντρωση 2mg/ml. Το BSA χρησιμοποιείται λόγω της σταθερότητας του να αυξάνει το σήμα σε εργαστηριακές δοκιμασίες και το χαμηλό κόστος του.

Lysis: Η διαδικασία που αναφέρεται στην κατάρριψη ενός κυττάρου κυρίως με την χρήση ενζύμων, ιών ή άλλων μηχανισμών. Η συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιείται μετά απο φυγοκέντρηση και εν τέλει έχω τις πρωτεΐνες μου στο κατάλληλο περιβάλλον. Η σύστασή του ανάλογα με την ποσότητα που χρησιμοποιείται είναι συγκεκριμένη και αποτελείται από PI και PMSF. Οι συγκεκριμένοι αναστολείς πρωτεάσης σερίνης και φωσφατάσης, μπλοκάρουν ένζυμα(protolytic, phospholytic) τα οποία προέρχονται από τα κύτταρα και διασπούν τις πρωτεΐνες.

BUFFER(BUF): Συνιστά το βασικό εργαλείο των αραιώσεών μας και η αναλογία του κάθε στιγμή είναι $\frac{1}{4}$ lysis και $\frac{3}{4}$ PBS.

Παρακάτω φαίνονται τα σχήματα που έγιναν πρώτα σε θεωρητικό επίπεδο και στην συνέχεια αποτελούσαν τον εγχειρίδιό μας για την διεξαγωγή του πειράματος.

- 2-fold αραιώση: Αραιώση κατά 50% ξεκινώντας από $\frac{1}{2}$ και φτάνοντας μέχρι $\frac{1}{128}$. (1, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{32}$, $\frac{1}{64}$, $\frac{1}{128}$)

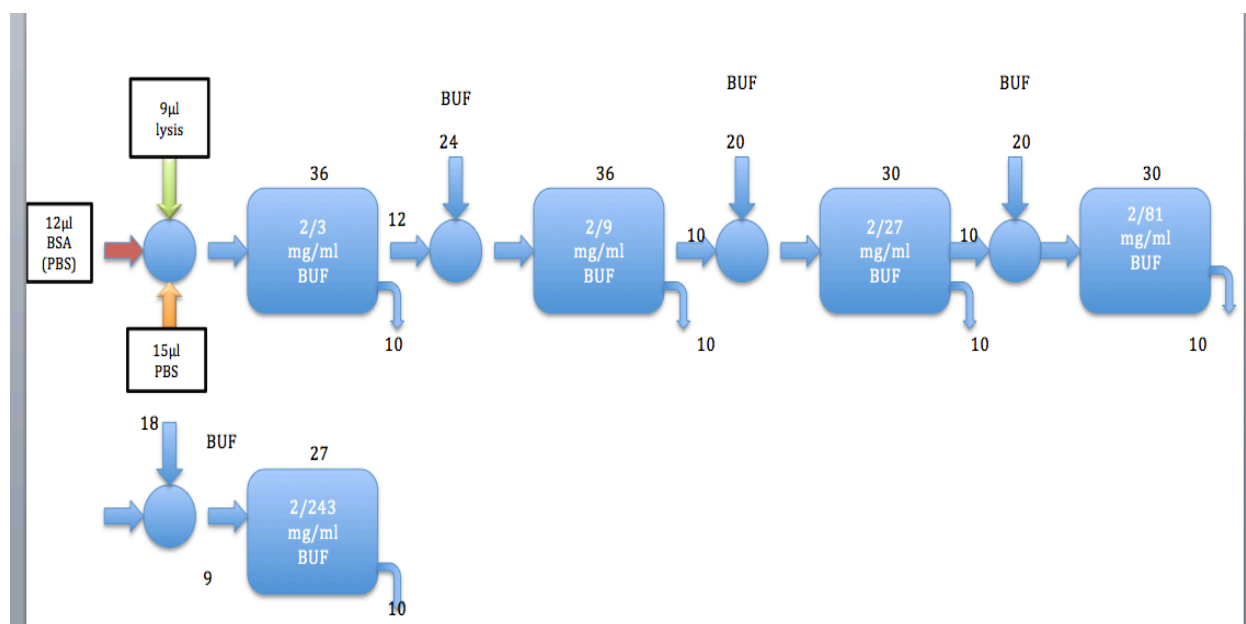


Στο συγκεκριμένο σχήμα ξεκινάμε από την τελευταία συγκέντρωση $\frac{1}{128}$ και σιγά σιγά πάμε προς τα προηγούμενα well υπολογίζοντας το BUF που χρειαζόμαστε. Στο τελευταίο well έχουμε διάλυμα συγκέντρωσης $\frac{1}{128}$ mg/ml και έχουμε θέσει ότι έχω 26 μl από τα οποία δεσμεύονται τα 10 μl για να πάνε σε well διαφορετικής στήλης όπου και μετά θα αναμυχθεί με το WR. Τα 26 μl

προέκυψαν όπως φαίνεται στο σχήμα από 13 μl διαλύματος συγκεντρώσεως 1/64 mg/ml και 13 μl διαλύματος BUF. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρι και το πρώτο well όπου εκεί τα πράγματα διαφοροποιούνται μερικώς. Συγκεκριμένα προκύπτει διάλυμα 50 μl συγκεντρώσεως 1 mg/ml. Δεδομένου της τηρούμενης αναλογίας ($\frac{1}{4}$ lysis $\frac{3}{4}$ PBS), προκύπτει ότι βάζω 12.5 μl lysis, 12.5 μl PBS και 25 μl BSA.

Αθροίζοντας όλες τις ποσότητες από BUF, PBS και lysis που χρησιμοποιήσαμε μπορούμε να αρχίσουμε να φτιάχνουμε τα διαλύματά μας με τα οποία θα επιτύχουμε τις αραιώσεις.

- 3-fold αραιώση: Αραιώση κατά 1/3 κάθε φορά ξεκινώντας από 2/3 και φτάνοντας μέχρι 2/243. (2/3, 2/9, 2/27, 2/81, 2/243)

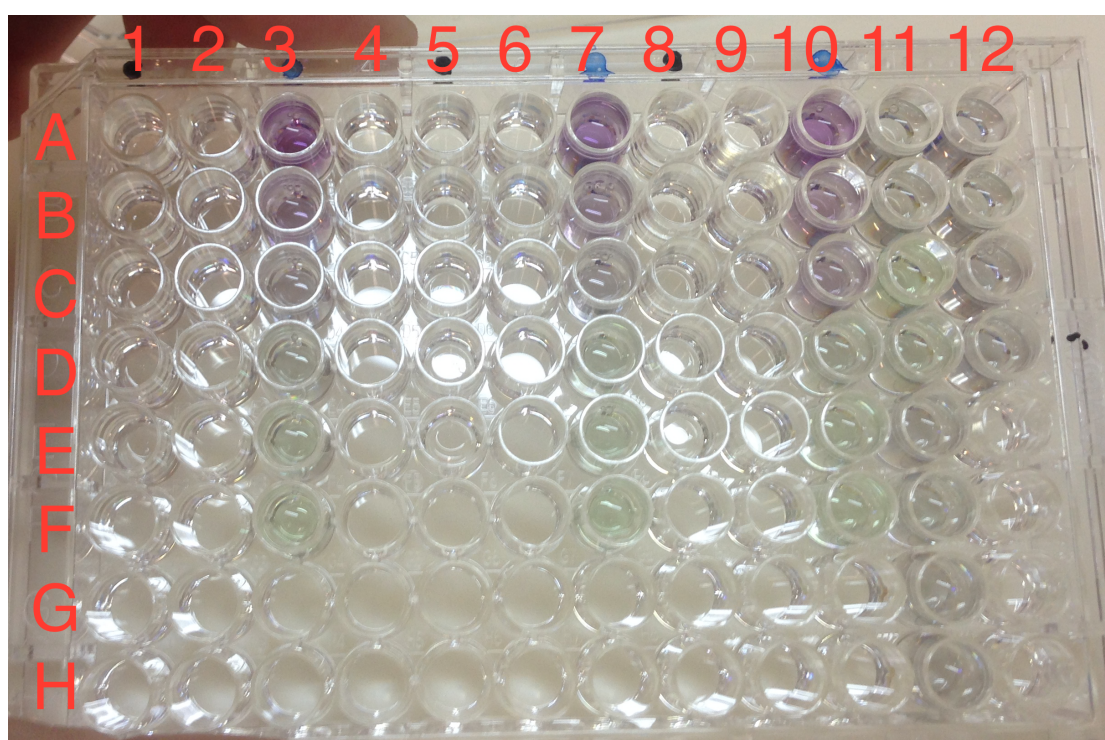


Στο συγκεκριμένο σχήμα ξεκινάμε από την τελευταία συγκέντρωση 2/243 και σιγά σιγά πάμε προς τα προηγούμενα well υπολογίζοντας το BUF που χρειαζόμαστε. Στο τελευταίο well έχουμε διάλυμα συγκέντρωσης 2/243 mg/ml και έχουμε θέσει ότι έχω 27 μl από τα οποία δεσμέονται τα 10 μl για να πάνε σε well διαφορετικής στήλης όπου και μετά θα αναμυχθεί με το WR. Τα 27 μl προέκυψαν όπως φαίνεται στο σχήμα από 9 μl διαλύματος συγκεντρώσεως 2/81 mg/ml και 18 μl διαλύματος BUF. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρι και το πρώτο well όπου εκεί τα πράγματα διαφοροποιούνται μερικώς. Συγκεκριμένα προκύπτει διάλυμα 36 μl συγκεντρώσεως 2/3 mg/ml. Δεδομένου της τηρούμενης αναλογίας ($\frac{1}{4}$ lysis $\frac{3}{4}$ PBS), προκύπτει ότι βάζω 9 μl lysis, 15 μl PBS και 12 μl BSA.

Αθροίζοντας όλες τις ποσότητες από BUF, PBS και lysis που χρησιμοποιήσαμε μπορούμε να αρχίσουμε να φτιάχνουμε τα διαλύματά μας με τα οποία θα επιτύχουμε τις αραιώσεις.

Παρακάτω ακολουθούν αναλυτικά τα βήματα που ακολούθησαν στην 3-fold αραιώση και επιλέξαμε να περιγράψουμε λεπτομερώς.

Βήματα 3-fold αραιώσης



Εικόνα: Σχηματική απεικόνιση του well που προέκυψε

Βήμα 1: Δημιουργία των κατάλληλων αραιώσεων

- Τοποθετήσαμε 400μl PBS, 200μl lysis και 300μl BUF σε σωλήνες eppendorf
- Στο well 1a τοποθετήσαμε συγκεκριμένη ποσότητα πρότυπου διαλύματος BSA(2mg/ml), αραιώνοντάς το με lysis και PBS προκειμένου να αποκτήσει την επιθυμητή συγκέντρωση 2/3 mg/ml
- Από το well 1a παίρνουμε με την πιπέτα 10μl και τα τοποθετούμε στο well 3a το οποίο και συνιστά το well προς μέτρηση.
- Στο 1b επιθυμούμε να επιτύχουμε συγκέντρωση 2/9 mg/ml. Προκειμένου να γίνει αυτό, παίρνουμε συγκεκριμένη ποσότητα από το well 1a και την αραιώνουμε με το έτοιμο BUF που έχουμε κατασκευάσει.
- Από το well 1b πιπετάρουμε 10μl στο well 3b

- Η συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιείται μέχρι το well 1e που αποκτάει συγκέντρωση 2/243 mg/ml και αντίστοιχα γίνεται η μεταφορά 10μl μέχρι και το 3e
- Στο well 1f τοποθετούμε το control που περιέχει μόνο BUF και αποτελεί δείγμα ελέγχου της πρωτεΐνης. Αντίστοιχα γίνεται η μεταφορά των 10μl στο well 3f

Βήμα 2: Παρασκευή Working Reagent και ανάμιξή του

- Η Παρασκευή του WR γίνεται από την ανάμιξη του αντιδραστηρίου A και του αντιδραστηρίου B
- Για τον υπολογισμό της ποσότητας του A υπολογίζω τον συνολικό αριθμό των well που χρησιμοποίησα ($6 \times 3 + 12 = 30$) και αυτό τα πολλαπλασιάζω με τα 200μl wr που χρησιμοποίησα. Για λόγους ασφάλειας αντί για 6000μl A που απαιτούνται με ακρίβεια, βάζω 6400μl
- Για τον υπολογισμό της ποσότητας B κάνω την διαίρεση $\frac{6400}{50} = 128\mu\text{l}$ (αναλογία 50:1)
- Ανακατεύοντας τα δύο παραπάνω αντιδραστήρια δημιουργώ το WR
- Στα well 11a-11c τοποθετούμε τα samples 20.000 κυττάρων, στα well 11d-11f τα samples των 30.000 κυττάρων, στα well 11g, 11h και 12^a τα samples των 40.000 κυττάρων και τέλος στα well 12b-12d τα samples των 50.000 κυττάρων.
- Στην συνέχεια χρησιμοποιούμε την πολλαπλή πιπέτα για την προσθήκη και ανάμιξη 200μl στα απαιτούμενα well (3a-3f), (7a-7f), (10a-10f) και (11a-12d)

Βήμα 3: Επώαση της πλάκας των δειγμάτων στο incubator στους 37°C για 30 λεπτά

Βήμα 4: Μέτρηση της απορροφητικότητας κάθε well με χρήση φασματοφωτόμετρου-plate reader

Βήμα 5: Κατασκευή της καμπύλης σημείων με τεταγμένη την απορροφητικότητα και τετμημένη την συγκέντρωση

Βήμα 6: Εύρεση της βέλτιστης δυνατής ευθείας με μορφή $y=ax+b$ που περνάει όσο το δυνατόν κοντύτερα από τα σημεία (μέθοδος ελαχίστων τετραγώνων)

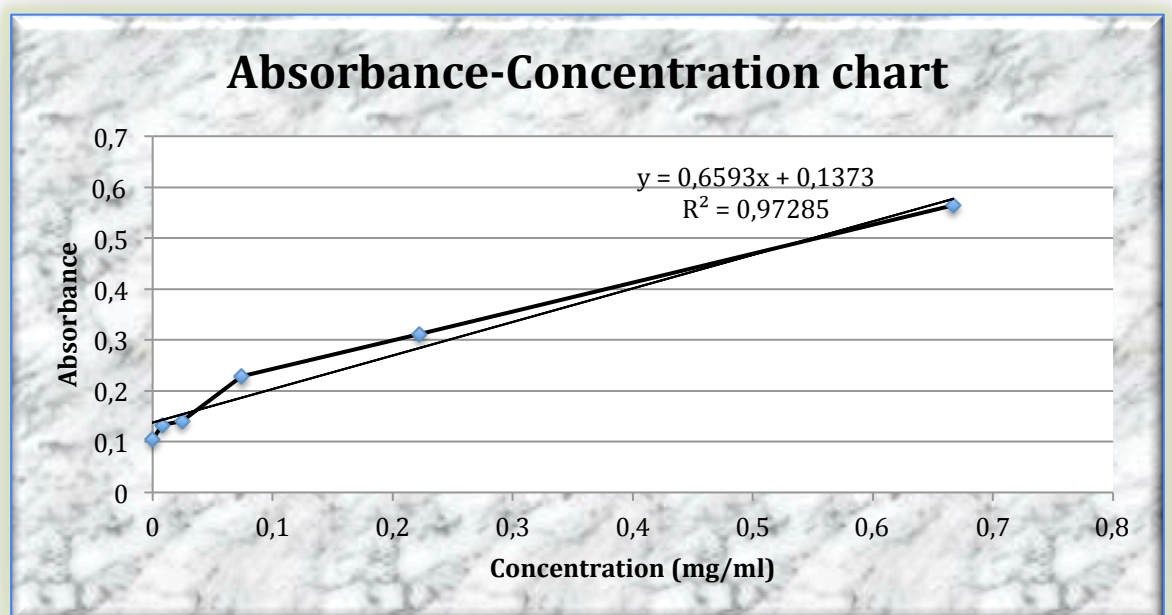
Βήμα 7: Δεδομένου της καμπύλης και της μετρημένης απορροφητικότητας των δειγμάτων βρίσκουμε την συγκέντρωσή τους και στην συνέχεια της μάζα τους και τον αριθμό των κυττάρων

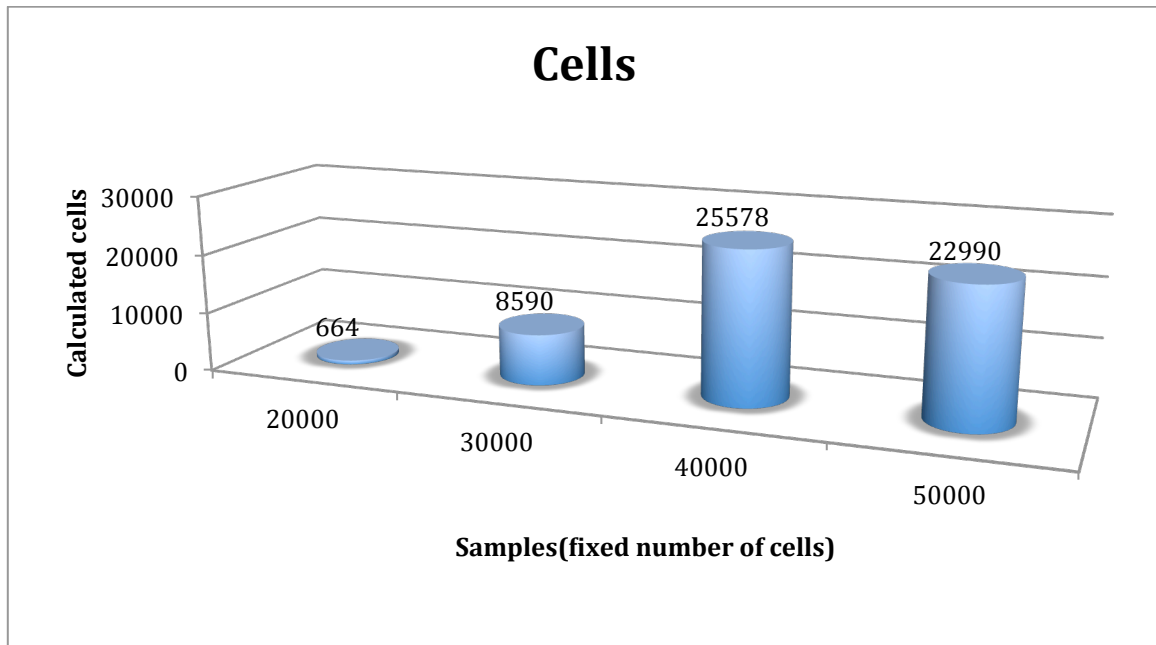
Σημείωση: Τόσο στην 3-fold όσο και στην 2-fold αραιώση επαναλαμβάνουμε κάθε στήλη αραιώσεων 3 φορές, επομένως και τα μετρούμενα well είναι 3 φορές. Αυτό το κάνουμε για να επαληθεύσουμε στατιστικά τα αποτελέσματά μας. Επιπρόσθετα αφού υπολογιστεί η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο δείγμα πολλαπλασιάζεται επι τέσσερα καθώς έχουμε πάρει το $\frac{1}{4}$ του sample. Τέλος ο

όγκος στην 3-fold αραιώση είναι 40μl ενώ στην 2-fold είναι 70μl. Μπορώντας να βρούμε την μάζα και γνωρίζοντας ότι στους ινοβλάστες έχουμε 0,5 ng πρωτεΐνης ανά cell, βρίσκουμε το συνολικό αριθμό των κυττάρων του δείγματος.

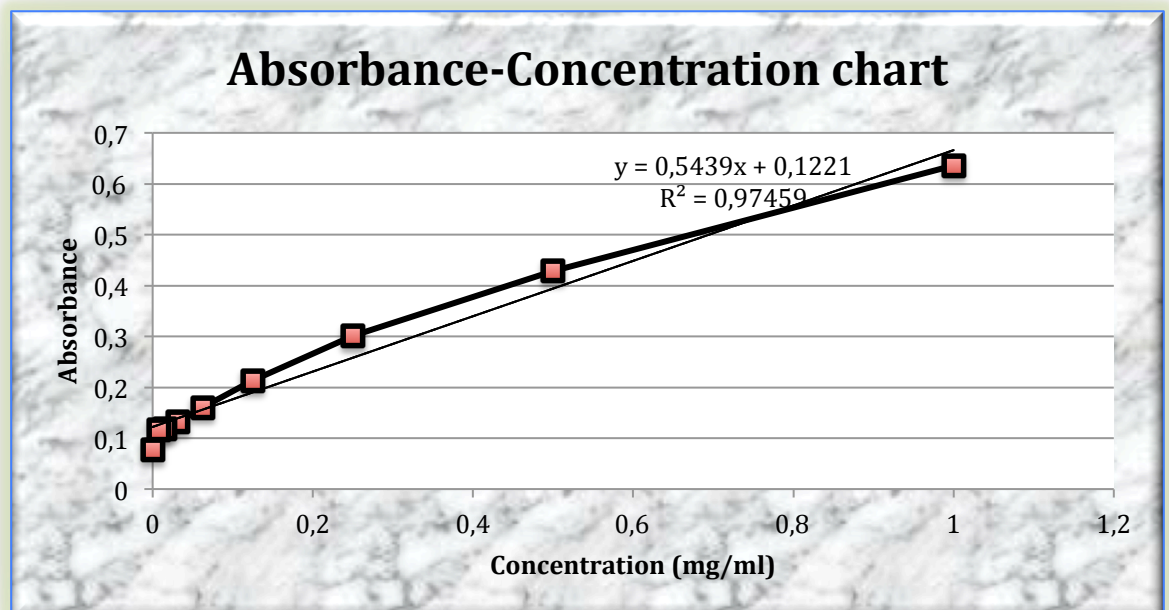
Αποτελέσματα 2-fold, 3-fold αραιώσης

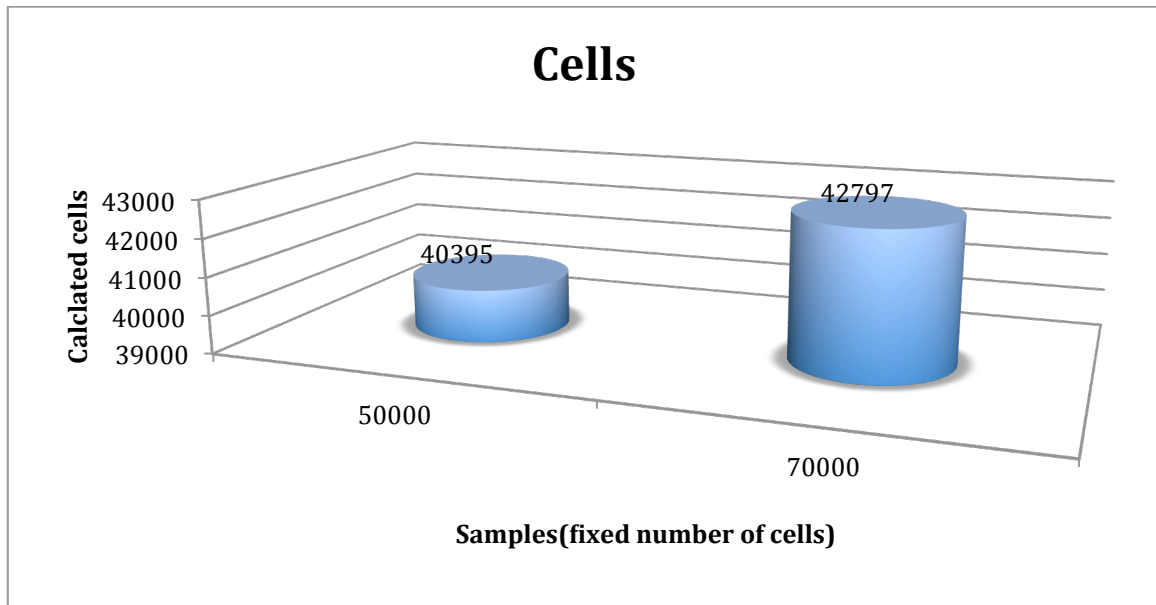
3-fold





2-fold





Bibliography

- Pierce Manual protein assay
- http://en.wikipedia.org/wiki/Bicinchoninic_acid_assay
- <http://www.piercenet.com/method/protein-assay-data-analysis>
- <http://www.piercenet.com/product/bca-protein-assay>
- <https://www.piercenet.com/instructions/2161296.pdf>
- http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc463a/Info/lecture_notes/colorimetric.pdf
- <http://research.med.helsinki.fi/corefacilities/proteinchem/Protein%20quantification%20and%20detection%202012.pdf>
- https://portal.utpa.edu/portal/page/portal/utpa_main/daa_home/hshs_home/reg_bio_home/reg_bio_images_files/Crucial%20Concentration.pdf
- <http://www2.lv.psu.edu/jxm57/irp/prot.htm>
- <http://www.mikeblaber.org/oldwine/BCH40531/Lecture03/Lecture03.htm>
- <http://www2.onu.edu/~k-broekemeier/Chem314/ReviewProteinMethods.pdf>
- <http://people.umass.edu/~mcclemen/581Proteins.html>
- <http://info.gbiosciences.com/blog/bid/174898/Using-Assays-in-Determining-Protein-Concentration>
- http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/practical_biochemistry/ch04s05.html
- <http://www2.lv.psu.edu/jxm57/irp/prot.htm>